

Studien zu Genominsele in und zur Virulenz von *Francisella*

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

von

M.Sc. Hana Tlapák

Präsidentin/Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen

1. PD Dr. Klaus Heuner
2. Prof. Dr. Thomas Eitinger
3. Prof. Dr. Thomas Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 2019

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 Biologie und Vorkommen von <i>Francisella</i>	5
1.2 <i>Francisella</i> als Krankheitserreger	5
1.3 Der intrazelluläre Lebenszyklus von Francisellen	6
1.4 <i>Francisella hispaniensis</i>	8
1.5 Mobile genetische Elemente.....	8
1.5.1 Bakteriophagen	10
1.5.2 Ortsspezifische Rekombinasen.....	10
1.5.2.1 Tyrosin-Rekombinasen	11
1.5.2.2 Serin-Rekombinasen	13
1.5.3 Phagenbasierte Vektoren	14
1.6 Genetische Manipulation von <i>Francisella</i>	14
1.7 Der putative Phage von <i>Francisella hispaniensis</i>	15
1.8 Zielsetzung	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Bakterienstämme	19
2.1.1.1 <i>Francisella</i>	19
2.1.1.2 <i>Escherichia coli</i>	20
2.1.2 Genome.....	21
2.1.3 Oligonukleotide	21
2.1.4 Vektoren	24
2.1.5 Plasmide.....	24
2.1.6 Zusätze zu Nährmedien	26
2.1.7 Verwendete Kits	26
2.1.8 Verwendete Enzyme.....	27
2.1.9 Größenstandards	28
2.1.9.1 DNA-Größenstandard	28
2.1.9.2 Protein-Größenstandard	28
2.1.10 Geräteliste	29
2.1.11 Chemikalien.....	30
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterien.....	31
2.2.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	31

2.2.1.2	Kultivierung von <i>Francisella</i>	31
2.2.1.3	Konservierung von Bakterien	32
2.2.2	Kultivierung von U937-Zellen	32
2.2.3	Zellzahlbestimmung	32
2.2.3.1	Bestimmung der Zellzahl nach Neubauer.....	32
2.2.3.2	Bestimmung der Lebendzellzahl mit dem Spiralplater.....	33
2.2.3.3	Photometrische Bestimmung der Zellzahl	33
2.2.4	Nukleinsäuretechniken	33
2.2.4.1	Synthetisch hergestellte Konstrukte.....	33
2.2.4.2	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Francisella</i>	35
2.2.4.3	Isolierung von Plasmid- DNA aus <i>E. coli</i>	35
2.2.4.4	Restriktionsverdau von DNA.....	35
2.2.4.5	Dephosphorylierung linearisierter DNA.....	36
2.2.4.6	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese.....	36
2.2.4.7	Isolierung von DNA aus dem Agarosegel	37
2.2.4.8	DNA-Fällung	38
2.2.4.9	Ligation von DNA mit der T4-Ligase	38
2.2.4.10	Ligation von DNA mit dem pGEM®-T Easy-Kit	38
2.2.4.11	Polymerase- Kettenreaktion (PCR).....	39
2.2.4.12	Aufkoch-PCR.....	41
2.2.4.13	Semiquantitative PCR.....	41
2.2.4.14	Real-time PCR	42
2.2.4.15	DNA-Sequenzierung.....	43
2.2.5	Transformation von Bakterien.....	44
2.2.5.1	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	44
2.2.5.2	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i>	44
2.2.5.3	Herstellung elektrokompeter Francisellen	44
2.2.5.4	Transformation elektrokompeter Bakterien	45
2.2.6	Proteintechniken	45
2.2.6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2.2.6.2	Western Blot (Semi-Dry-Verfahren)	47
2.2.6.3	Detektion von Proteinen mit Antikörpern.....	47
2.2.7	Stabilitätstestung.....	48
2.2.8	Infektionsversuche	48
2.2.9	Bestimmung der Transformationseffizienz	50
2.2.10	<i>In Silico</i> Analyse.....	50
3.	Ergebnisse.....	51
3.1	Die Genominsel FhaGI-1	51
3.1.1	Funktionelle Charakterisierung von FhaGI-1	51

3.1.1.1	Funktionalität in <i>E. coli</i>	52
3.1.1.2	Funktionalität in <i>Francisella</i>	54
3.1.2	Die tRNA ^{Val} als Integrationsort in <i>Francisella</i>	56
3.1.2.1	Genominseln in <i>Francisella philomiragia</i>	57
3.1.2.2	Funktionalität von FphGI-1	59
3.1.3	Die Rolle der Integrase und des Repeats	60
3.1.3.1	Funktionalität in <i>E. coli</i>	61
3.1.3.2	Funktionalität in <i>Francisella</i>	63
3.2	FhaGI-1 als ortsspezifischer Integrationsvektor.....	66
3.2.1	Überprüfung des Konzepts mit einem ersten Konstrukt.....	66
3.2.2	Funktionale Charakterisierung von pFIV1-Val	69
3.2.3	Weiterführende Optimierung pFIV2-Val	72
3.2.4	Stabilität und Kopienzahl	74
3.2.5	pFIV3-Val.....	77
3.3	Ist FhaGI-1 ein funktionaler Bakteriophage.....	80
3.3.1	Klonierung der zweiten Hälfte von FhaGI-1	81
3.3.2	Zusammenführen von GI-1 und GI-2	84
4.	Diskussion.....	89
4.1	Die GI FhaGI-1.....	89
4.1.1	Funktionelle Charakterisierung von FhaGI-1	89
4.1.2	Die tRNA ^{Val} als Integrationsort für GIs.....	92
4.1.3	Bedeutung von Repeat und Integrase	94
4.2	FhaGI-1 als Integrationsvektor.....	97
4.2.1	Der Integrationsvektor pFIV1-Val	97
4.2.2	Optimierung und weiterführende Charakterisierung der FIV-Vektoren	99
4.2.3	Weiterführende Vektorvarianten	101
4.3	Ist FhaGI-1 ein Phage?	104
4.3.1	Klonierung von Fhis3523-GI-2	104
4.3.2	Das Zusammenführen der Hälften von FhaGI-1	105
4.4	Ausblick.....	108
	Literaturverzeichnis.....	111
	Anhang	121
	Abkürzungsverzeichnis.....	130
	Danksagung.....	133
	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Tagungen und Publikationen	134
	Eidesstattliche Erklärung	135

Zusammenfassung

Kürzlich wurde die genomische Insel (GI) FhaGI-1 des Stammes *Francisella hispaniensis* AS02-814 beschrieben, die sowohl in die tRNA^{Val} integriert als auch als episomale Form vorliegen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Verwendung synthetisch hergestellter, verkürzter Varianten von FhaGI-1 gezeigt werden, dass FhaGI-1 auf andere *Francisella*-Spezies übertragen werden kann. Die ortsspezifische Integrase von FhaGI-1 ist sowohl ausreichend als auch notwendig für die vollständige Funktion. Es wurde jedoch deutlich, dass die Integration und Exzision der GI durch weitere Gene, deren genaue Funktion noch bestimmt werden muss, beeinflusst wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die tRNA^{Val} als Integrationsort für GIs in *Francisella* dient. Die GI FphGI-1 wurde in den Stämmen *Francisella philomoragia* (Fph) ATCC 25016, Fph ATCC 25017 und Fph ATCC 25018 identifiziert. Die episomale Form von FphGI-1 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass vermutlich die Integrase von FphGI-1 nicht funktional und damit wahrscheinlich die Ursache für die fehlende Funktionalität von FphGI-1 ist und nicht die mutierte *attR*-Stelle der GI. Das Vorhandensein von GIs in *Francisella* könnte ein Hinweis darauf sein, dass horizontaler Gentransfer zwischen verschiedenen *Francisella*-Spezies durchaus möglich ist.

Auf Grundlage von FhaGI-1 wurden erfolgreich zwei Varianten eines *Francisella*-Phagenintegrationsvektors, genannt pFIV1-Val und pFIV2-Val, generiert. Die Integrationsvektoren bestehen aus *attL*- und *attR*-Stellen, der ortsspezifischen Integrase (FN3523_1033) von FhaGI-1, sowie einer Chloramphenicolresistenzkassette. Die Elemente liegen in den pUC57-Kana-Vektor integriert vor, um eine Amplifikation in *E. coli* zu ermöglichen. Zur Vereinfachung der negativen Selektion des Vektorrückgrates wurde in pFIV2-Val eine *sacB*-Gen integriert, das die negative Selektion auf Sucrose-Agar ermöglicht. Der FIV-Teil der Vektoren bildet eine zirkuläre, episomale Form, die nach der Transformation in verschiedene *Francisella*-Spezies ortsspezifisch in die tRNA^{Val} integriert. Es konnte gezeigt werden, dass die Vektoren für die Expression von Reportergenen (*gfp*) sowie für die Komplementation von *Francisella*-Deletionsmutanten durch die Expression von *Francisella*-Genen geeignet sind. Die Stabilität der Vektoren ohne Selektionsdruck wurde sowohl *in vitro* als auch während der Infektion von Wirtszellen nachgewiesen. Mit einer durchschnittlichen Kopienzahl von 3 bis 4 Kopien zählen die Vektoren zu den „low-copy“-Vektoren. Die

FIV-Val-Vektoren erweitern damit das Repertoire der vorhandenen Werkzeuge zur genetischen Manipulation von Francisellen. Eine Vektorvariante, bei der die episomale Form nicht mehr gebildet wird, konnte bisher nicht erfolgreich hergestellt werden.

Die gesamte GI FhaGI-1 kodiert für einen putativen Prophagen. Da der Stamm *Francisella hispaniensis* AS02-814 für Untersuchungen nicht zur Verfügung steht, sollte in dieser Arbeit die gesamte GI synthetisch hergestellt werden. Es ist gelungen, FhaGI-1 in zwei Hälften herzustellen, jedoch konnten diese bisher nicht zusammengeführt werden. Damit ist eine Aussage darüber, ob es sich bei FhaGI-1 tatsächlich um einen funktionalen Prophagen handelt, bis jetzt nicht möglich.

Schlagwörter: *Francisella tularensis*, *Francisella hispaniensis*, *Francisella philomiragia*, genomische Inseln, Integrationsvektor, pFIV-Val, Prophage

Summary

Recently, the genomic island (GI) FhaGI-1, located within the genome of strain *Francisella hispaniensis* AS02-814, was described. The GI can exist as a circular episomal form or integrated into the tRNA^{Val} gene.

In this work small-sized variants of FhaGI-1 were used to show that FhaGI-1 can be transferred to other *Francisella* species. The site-specific integrase of FhaGI-1 is not only sufficient but necessary for full functionality of the GI. It became clear that integration and excision of the GI are influenced by other genes that need to be further analysed regarding their function. Furthermore, it was shown that the tRNA^{Val} gene is an integration site for GIs in *Francisella*. The GI FphGI-1 was identified in the strains *Francisella philomoragia* (Fph) ATCC 25016, Fph ATCC 25017 and Fph ATCC 25018 but the episomal form of the GI could not be demonstrated. Further analyses showed that the integrase of FphGI-1 and not the mutated *attR*-site of the GI is probably non-functional and hence presumably the reason for the missing episomal form. The presence of GIs in *Francisella* might be an indication that horizontal gene transfer between different *Francisella* species could be possible.

Two variants of a *Francisella* phage integration vector (pFIV1-Val and pFIV2-Val) were successfully constructed based on FhaGI-1. The integration vectors consist of the *attL*- and *attR*-sites, the site-specific integrase (FN3523_1033) of FhaGI-1, as well as a chloramphenicol resistance cassette. All elements are integrated into the pUC57-Kana vector to allow propagation in *E. coli*. To simplify counter selection of the vector backbone a *sacB* gene was integrated into pFIV2-Val, which facilitates the negative selection on sucrose agar. The FIV-Val part of the vectors integrates site-specifically into the tRNA^{Val} after transformation into different *Francisella* species. It was demonstrated that the vectors can be used for the expression of reporter genes (*gfp*) as well as for the expression of *Francisella* genes and hence the complementation of *Francisella* deletion mutants. Both vectors remain stable without selective pressure during *in vitro* growth and during the infection of host cells. With copy numbers averaging 3 to 4 copies, the vectors fall into the group of low-copy-vectors. The FIV-Val vectors expand the repertoire of tools that can be used for the genetic manipulation of *Francisella*. So far, the development of a version of the vector that does not build an episomal form was unsuccessful.

The complete GI FhaGI-1 codes for a putative prophage. Since the strain *Francisella hispaniensis* AS02-814 could not be obtained for further analysis, the whole GI was supposed to be build synthetically. The synthesis of FhaGI-1 in two halves was achieved but as of yet, the joining of both halves was not successful. Consequently, it is not possible to state whether FhaGI-1 actually is a functional prophage.

Keywords: *Francisella tularensis*, *Francisella philomiragia*, genomic islands, integrative vector, pFIV-Val, prophage

1 Einleitung

1.1 Biologie und Vorkommen von *Francisella*

Francisellen sind fakultativ intrazellulär lebende, nicht bewegliche, gramnegative Bakterien und gehören zu den *Coccobaccilli*. Sie sind pleomorph und weisen eine Größe von 0,2-1,7 µm auf. Francisellen sind Teil der Familie der *Francisellaceae*, die zu der Klasse der γ-Proteobakterien gehört (Forsman et al., 1994; Hollis et al., 1989; Sjöstedt, 2007). Die Gattung *Francisella* beinhaltet die Spezies *Francisella tularensis* (*Ft*) (mit den Subspezies *Ft* ssp. *tularensis* (*Ftt*), *Ft* ssp. *holarctica* (*Fth*) und *Ft* ssp. *mediasiatica*), *Francisella novicida* (*Fno*), *Francisella philomiragia* (*Fph*), *Francisella hispaniensis* (*Fhis*), *Francisella noatunensis*, *Francisella haliotida*, *Francisella marina* und *Francisella persica* (Brevik et al., 2011; Hollis et al., 1989; Huber et al., 2010; Jensen et al., 1969; Larson et al., 1955; 2016; McCoy and Chapin, 1912; Ottem et al., 2009; Soto et al., 2018). Kürzlich wurde eine neue *Francisella*-Spezies (*Francisella* sp. Isolat W12-1067) aus einem Kühlturm in Deutschland isoliert (Rydzewski et al., 2014). Es ist jedoch noch nicht klar, ob die neue Spezies in die Gattung *Francisella* oder die neue Gattung *Allofrancisella* eingruppiert wird (Challacombe et al., 2017a; Qu et al., 2013; 2016).

Das natürliche Reservoir von Francisellen konnte bisher noch nicht identifiziert werden, sie konnten jedoch in einer Reihe von Säugetieren und Arthropoden nachgewiesen werden. Auch ein verbessertes Überleben, wenn auch keine Vermehrung, in freilebenden Amöben konnte gezeigt werden (Buse et al., 2017; Ellis et al., 2002; Petersen et al., 2009). Ein Überleben von *Ft* in Wasserhabitaten in einer „viable but non-culturable“ Form wird vermutet, jedoch konnte für diese Bakterien in Versuchen keine Infektiosität in Mäusen gezeigt werden. Auch eine Rekultivierung dieser Francisellen *in vitro* war bisher nicht erfolgreich (Forsman et al., 2000).

1.2 *Francisella* als Krankheitserreger

1912 wurde durch McCoy und Chapin erstmalig der Erreger einer pestartigen Infektion bei Eichhörnchen beschrieben und kultiviert. Nur zwei Jahre später wurde die erste Infektion beim Menschen beschrieben. Edward Francis führte extensive Untersuchungen an dem Erreger durch, der später nach ihm benannt wurde (McCoy and Chapin, 1912; Olsufiev et al.,

1959; Wherry and Lamb, 1914). Heute ist *Ft* als Erreger der Zoonose Tularämie, auch Hasenpest genannt, bekannt. Vorwiegend sind Tiere befallen, Menschen können sich jedoch durch Kontakt mit infizierten Organismen, wie zum Beispiel Nagetieren, Wild aber auch Arthropoden, sowie durch das Einatmen kontaminierter Aerosole anstecken. Je nach Weg der Infektion können beim Menschen verschiedene Formen der Tularämie, die von glandulär über pharyngeal bis hin zu respiratorischen Ausprägungen reichen, auftreten. Die verschiedenen Ausprägungen unterscheiden sich in der Schwere der Infektion, wobei die respiratorische Form die schwerwiegendste ist (Ellis et al., 2002). Patienten mit Tularämie präsentieren häufig zunächst grippe-ähnliche Symptome wie Fieber, Schüttelfrost und Gliederschmerzen (Ohara et al., 1991). Die Behandlung von Tularämie erfolgt mittels Antibiotika, die nicht der Gruppe der Penicilline angehören, da Francisellen gegen diese eine natürliche Resistenz aufweisen (Bina et al., 2006; Ellis et al., 2002). Durch die Behandlung mit Antibiotika ist die Mortalitätsrate der Tularämie gering (Hepburn and Simpson, 2008). Eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist bis heute nicht beschrieben.

Die verschiedenen Subspezies von *Ft* zeigen eine unterschiedlich hohe Virulenz. Die virulentere Subspezies *Ftt* kommt nur in Nordamerika vor, und es konnte gezeigt werden, dass bereits eine Infektionsdosis von nur 10- 20 Bakterien zu einer Erkrankung führen kann (Saslaw et al., 1961). Die weniger virulente Subspezies *Fth* ist in der gesamten nördlichen Hemisphäre verbreitet und weist mit $<10^3$ Bakterien eine höhere Infektionsdosis auf. Zudem werden Erkrankungen mit *Fth* im Allgemeinen mit einem milderem Krankheitsverlauf assoziiert (Celli and Zahrt, 2013). Opportunistische Infektionen durch *Fhis*, *Fno* und *Fph* sind nur bei immunkomprimierten Menschen beschrieben (Clarridge et al., 1996; Hollis et al., 1989; Whipp et al., 2003). Auf Grund der geringen Infektionsdosis und der möglichen Übertragung durch Aerosole wurde *Ft* als eine der biologischen Agenzien eingestuft, die als bioterroristische Waffe missbraucht werden könnten (Darling et al., 2002; Dennis et al., 2001).

1.3 Der intrazelluläre Lebenszyklus von Francisellen

Francisellen können eine Vielzahl von Wirtszelltypen, wie Makrophagen, dendritische Zellen, polymorphnukleäre Neutrophile, Hepatocyten, Endothelzellen und Typ II Alveolarepithelzellen infizieren und in ihnen proliferieren (Oyston et al., 2004). Abbildung 1

zeigt eine schematische Darstellung des intrazellulären Lebenszyklus von Francisellen in Makrophagen.

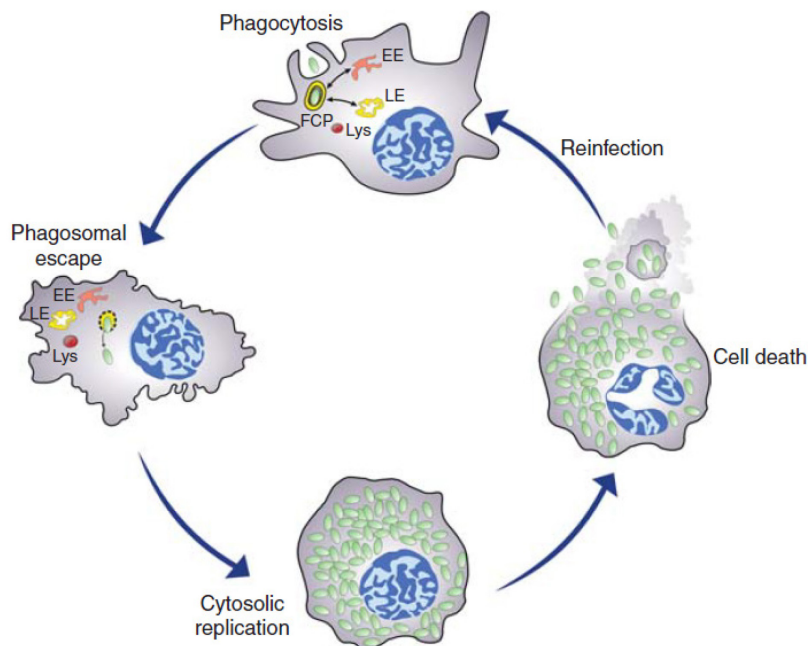


Abbildung 1: Schematische Darstellung des intrazellulären Lebenszyklus von *Francisella* in Makrophagen. Nach der Phagozytose befinden sich die Bakterien in einem frühen Phagosom (FCP), das mit frühen (EE) und späten (LE) endosomatischen Komponenten aber nicht mit Lysosomen (Lys) interagiert. Die Bakterien zerstören schnell die Membran des FCP und gelangen so in das Zytosol, in dem sie sich stark vermehren, bis der Zelltod eintritt, die Bakterien freigesetzt werden und neue Zellen infizieren (Celli and Zahrt, 2013).

Nach der Phagozytose durch Makrophagen befinden sich die Francisellen in einem frühen Phagosom („*Francisella*-containing phagosome“=FCP), das über ein frühes zu einem späten Endosom reift, jedoch nicht mit einem Lysosom fusioniert (Celli and Zahrt, 2013). Sie verhindern die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und antimikrobieller Peptide und umgehen damit die Abwehrmechanismen der Wirtszellen (Jones et al., 2012; McCaffrey et al., 2010). Das FCP wird angesäuert und die Francisellen entkommen nur wenige Stunden nach der Infektion in das Zytosol (Ozanic et al., 2015). Eine wichtige Rolle spielen bei diesem Prozess die Gene der *Francisella*-Pathogenitätsinsel (FPI), welche für ein Typ VI-Sekretionssystem kodieren (Barker et al., 2009). Die FPI liegt in den humanpathogenen Spezies *Ftt* und *Fth* in zweifacher Kopie vor, während sie in der den Menschen nur opportunistisch infizierenden Spezies *Fno* in nur einfacher Kopie vorliegt (Nano et al., 2004). Für Mutanten, bei denen verschiedene Gene der FPI deletiert wurden, konnte gezeigt werden, dass diese nicht mehr aus dem Phagosom entkommen und sich nicht vermehren können (Barker et al., 2009; Golovliov

et al., 2003; Straskova et al., 2012). Nachdem die Bakterien in das Zytosol entkommen sind, beginnen sie sich zu vermehren, bis es schließlich zur Apoptose der Wirtszelle kommt, die Francisellen freigesetzt werden und neue Zellen infizieren können (Celli and Zahrt, 2013).

1.4 Francisella hispaniensis

Ein Stamm der Spezies *Francisella hispaniensis* wurde erstmals 2003 in Spanien aus menschlichem Blut isoliert, damals aber noch der Spezies *Fno* zugeordnet. Huber et al. zeigten 2010 jedoch, dass es sich bei dem Stamm um eine eigenständige Spezies, *Francisella hispaniensis*, handelt. Sie beschrieben die Spezies als pleomorphe, kokkoide Stäbchen mit einer Größe von 0,5 x 1,5 µm. Für das Wachstum im Labor stellten sie einen Temperaturbereich von 20-42°C mit einem Optimum von 37°C fest. Heute wird der in Spanien isolierte Stamm als *Fhis* FSC454 bezeichnet (Huber et al., 2010). Das erste *Francisella*-Isolat der südlichen Hemisphäre wurde 2003 von einem Patienten isoliert, der sich durch eine Verletzung in Brackwasser infiziert hatte. Das Isolat wurde zunächst als *Francisella novicida*-like 3523 bezeichnet. Spätere Genomanalysen wiesen jedoch darauf hin, dass dieser Stamm ebenfalls der Spezies *Fhis* zugeordnet werden kann (Sjödín et al., 2012; Whipp et al., 2003). Der Stamm wird beim CDC („Centers for Disease Control and Prevention“) in den USA unter der Bezeichnung AS02-814 geführt.

1.5 Mobile genetische Elemente

Neben dem häufig gut konservierten Kerngenom, das die Informationen für essentielle zelluläre Funktionen enthält und sich bei nahverwandten Spezies ähnelt, besitzen Bakterien einen flexiblen Genpool, der für Eigenschaften kodiert, die unter bestimmten Umweltbedingungen vorteilhaft sein können. Dieses flexible Genom kann sich auch bei nahverwandten Bakterienstämmen stark unterscheiden und wird durch mobile genetische Elemente (MGEs) gebildet (Dobrindt et al., 2004). Zu den MGEs zählen neben Plasmiden, die als extrachromosomale, zirkuläre und selbstreplizierende Elemente vorliegen, auch Gruppen von Genen, die vermutlich über horizontalen Gentransfer erlangt wurden, als diskrete Bereiche im Genom liegen und unter dem Begriff der genomischen Inseln (GIs) zusammengefasst werden (Bertelli et al., 2018; Juhas et al., 2009). Der Begriff der GIs wurde erstmals durch Hacker und Kollegen geprägt, die ein Gencluster, das für die Virulenz von uropathogenen *E. coli* verantwortlich ist, als Pathogenitätsinsel (PAI) bezeichnet haben

(Hacker et al., 1990). Seither wurde das Konzept der GIs erweitert und umfasst Genombereiche, die für eine Vielzahl von Funktionen kodieren und einen Selektionsvorteil für ihren Wirt bringen können. Abhängig von den enthaltenen Genen werden sie als Symbiose-, Metabolismus-, Fitness- oder Resistenzinsel bezeichnet (Dobrindt et al., 2004; Juhas et al., 2009; Schmidt and Hensel, 2004). Heute werden unter dem Begriff der GIs verschiedene Elemente zusammengefasst, die Bakteriophagen, konjugative Transposons, ICEs („*integrative conjugative elements*“), IS- („*insertion sequence*“) Elemente, Integrans und genomische Islets (<10kb) beinhalten (Dobrindt et al., 2004; Hacker and Carniel, 2001). GIs sind in der Regel zwischen 10 und 200 kb groß und weisen gegenüber dem Kerngenom einen veränderten GC-Gehalt auf (Hacker and Carniel, 2001).

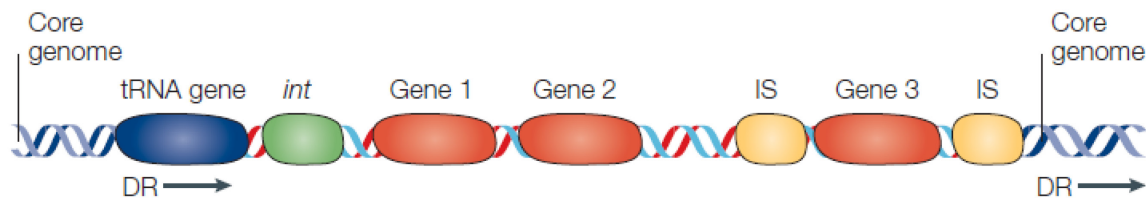


Abbildung 2: Allgemeine Charakteristika genomischer Inseln. Genomische Inseln (GIs) stellen durch horizontalen Gentransfer erlangte DNA-Regionen dar, die in der Regel in der Nähe von tRNA-Genen chromosomal integriert sind. Eine typische GI ist durch „direct repeats“ (DR) flankiert und beinhaltet mehrere Gene, die für Eigenschaften kodieren, die unter bestimmten Umweltbedingungen einen positiven Einfluss auf die bakterielle Anpassungsfähigkeit oder Fitness haben können (hier durch Gene 1 bis 3 dargestellt). Typischer Weise tragen GIs mehrere funktionale oder fragmentierte IS-Elemente und andere Mobilitäts-assoziierte Gene, sowie eine funktionales Integrasesgen (*int*), dessen Produkt an der Insertion und Deletion von DNA-Regionen, die durch DRs flankiert wird, beteiligt ist (Dobrindt et al., 2004).

Zudem weisen GIs strukturelle Gemeinsamkeiten auf, die in Abbildung 2 dargestellt sind. Sie sind häufig mit tRNA-Genen assoziiert und werden von kurzen DNA-Sequenzen flankiert, die als Rekombinationsstellen dienen und als „direct repeats“ (DR) bezeichnet werden (Hacker et al., 1997; Reiter et al., 1989; Williams, 2002). Diese DRs dienen Rekombinasen oder Integrasen, die ebenfalls auf den GIs kodiert sind, als Erkennungsstellen für die ortsspezifische Integration und Exzision aus dem Wirtsgenom (Hacker et al., 1997). Neben diesen Enzymen können GIs auch konjugative Systeme, IS-Elemente oder Transposons enthalten, die den Transfer auf andere Bakterien ermöglichen (Buchrieser et al., 1998; Gal-Mor and Finlay, 2006).

1.5.1 Bakteriophagen

Bakteriophagen sind Viren, die Bakterien infizieren. Sie sind ubiquitär verbreitet und stellen mit einer Zahl von ca. 10^{31} die häufigste biologische Einheit der Biosphäre dar (Brüssow and Hendrix, 2002; Fortier and Sekulovic, 2013). Nach der Bindung an Oberflächenrezeptoren und der Injektion ihres Genoms in das Zytosol der Wirtszelle nutzen lytische (virulente) Phagen sofort die molekulare Maschinerie der Wirtszelle für die Replikation ihres Genoms, sowie die Transkription und Translation der Phagengene. Nach der Assemblierung der synthetisierten Proteine zu Kopf- und Schwanzpartikeln, wird das Phagengenom in die Köpfe verpackt. Durch lytische Proteine wird die Wirtszelle zerstört und eine Vielzahl an infektiösen Phagenpartikeln freigesetzt, die neue Zellen infizieren können (Davies et al., 2016; Fortier and Sekulovic, 2013). Lysogene (temperente) Phagen können nach der Infektion von Wirtszellen neben dem lytischen Weg auch einem alternativen Lebenszyklus folgen, bei dem sie latent in der Bakterienzelle verbleiben, entweder als Episom oder in das Bakterienchromosom integriert. Der so entstandene Prophage wird zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert (Howard-Varona et al., 2017; Ofir and Sorek, 2018). Der Wechsel zwischen lytischem und lysogenem Wachstum wird beim λ -Phagen durch einen komplexen molekularen Schalter bestimmt. Der Repressor CI unterdrückt durch Bindung an Promotoren die Expression lytischer Gene, inklusive des Cro-Repressors, der die Expression lytischer Gene fördert (Oppenheim et al., 2005; Ptashne, 2004). Der lysogene Status des Phagen ist sehr stabil, und nur ein sehr geringer Teil lysogener Zellen wird spontan lysiert (Little et al., 1999). Ein Wechsel zum lytischen Wachstum wird häufig durch DNA-Schäden, die zu einer SOS-Antwort der Wirtszelle führen, ausgelöst. Das durch die SOS-Antwort aktivierte bakterielle RecA bindet den CI-Repressor, der Ähnlichkeiten zum bakteriellen LexA aufweist, und induziert dessen Abbau (Hochschild and Lewis, 2009; Little et al., 1999; Sauer et al., 1982). Durch diesen Abbau wird die Transkription lytischer Proteine, einschließlich des Cro-Repressors, der die Transkription von CI im Folgenden unterdrückt, eingeleitet und der Phage wechselt zum lytischen Wachstum (Schubert et al., 2007; Takeda, 1979).

1.5.2 Ortsspezifische Rekombinasen

Die ortsspezifische Integration von Phagen in das Wirtsgenom erfolgt durch phagenkodierte Rekombinasen, die auch als Integrasen bezeichnet werden (Juhas et al., 2009). Der Prozess der Rekombination ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Das Integraseenzym katalysiert die Rekombination zwischen einer kurzen Phagen-DNA-Sequenz, der Phagenbindungsstelle

(„*phage attachment site*“= *attP*) und einer kurzen Sequenz bakterieller DNA, der Bakterienbindungsstelle („*bacterial attachment site*“= *attB*) (Campbell, 2003). Der so integrierte Phage wird auf beiden Seiten durch Hybridstrukturen, die zu einer Hälfte aus *attP* und zur anderen Hälfte aus *attB* bestehen, flankiert. Diese Hybridstrukturen werden als *attL* und *attR* bezeichnet und dienen als Substrate für die Exzision aus dem Genom (Fogg et al., 2014; Groth and Calos, 2004).

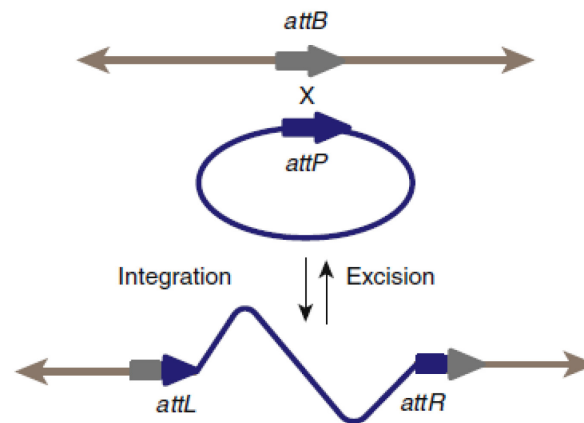


Abbildung 3: Überblick über die Phagenintegration. Nach dem Eindringen in die Wirtszelle liegt das Phagen-genom in einer zirkulären Form vor (blauer Kreis). Diese Form kann über die Phagenbindungsstelle („*phage attachment site*“= *attP*, blauer Pfeil) in die bakterielle Bindungsstelle („*bacterial attachment site*“= *attB*, grauer Pfeil) integrieren. Durch die Integrationsreaktion entsteht ein Prophage, der durch die neuen Bindungsstellen *attL* und *attR* flankiert wird, die Hybride aus *attP* und *attB* darstellen. Die Exzision geschieht zwischen *attL* und *attR*, wodurch *attP* auf dem exzidierten Phagen-genom und *attB* im Wirtschromosom wiederhergestellt werden (Fogg et al., 2014).

Abhängig von ihrem katalytischen Rest lassen sich die Rekombinasen in zwei Gruppen, die Serin-Rekombinasen und die Tyrosin-Rekombinasen, aufteilen (Esposito and Scocca, 1997; Nunes-Duby et al., 1998; Smith and Thorpe, 2002)

1.5.2.1 Tyrosin-Rekombinasen

Der wohl bekannteste Vertreter der Tyrosin-Rekombinasen und das Gründungsmitglied der Gruppe der Tyrosin-Integrasen ist die λ -Integrase (Int) des λ -Phagen (Meinke et al., 2016). Tyrosin Rekombinasen tragen einen Tyrosin-Rest in ihrem katalytischen Zentrum, mit dem die DNA angegriffen wird. Die Rekombination läuft bei Tyrosin-Rekombinasen als zweistufiger Prozess über eine intermediäre Struktur ab. Wie in Abbildung 4 gezeigt, binden zunächst vier Rekombinase-Monomere an zwei DNA-Doppelsträngen, und ein synaptischer

Komplex wird gebildet, bei dem jeweils zwei Monomere und einen DNA-Doppelstrang binden. Von den vier Rekombinase Monomeren sind zu jedem Zeitpunkt nur zwei aktiv, wodurch es zu Einzelstrangsnitten kommt. Die Rekombination beginnt in den aktiven Monomeren durch den nukleophilen Angriff des Tyrosinrests auf das Phosphatrückgrat des DNA-Doppelstrangs, durch den ein Einzelstrang geschnitten wird und ein 3'-Phosphotyrosin-Intermediat entsteht. Die ebenfalls entstandene 5'-Hydroxylgruppe greift das Phosphotyrosin-Intermediat des gegenüberliegenden DNA-Stranges an, und es kommt zur Ausbildung der Holliday-Struktur. Durch eine Konformationsänderung werden die DNA-Stränge neu ausgerichtet, die bisher aktiven Monomere werden inaktiviert und die zuvor inaktiven Monomere aktiviert. Durch eine Wiederholung der zuvor beschriebenen Prozesse mit den verbleibenden zwei DNA-Strängen kommt es zur Auflösung der Holliday-Struktur und des gesamten Rekombinationskomplexes. Am Ende liegen zwei rekombinante DNA-Doppelstränge vor (Grindley et al., 2006).

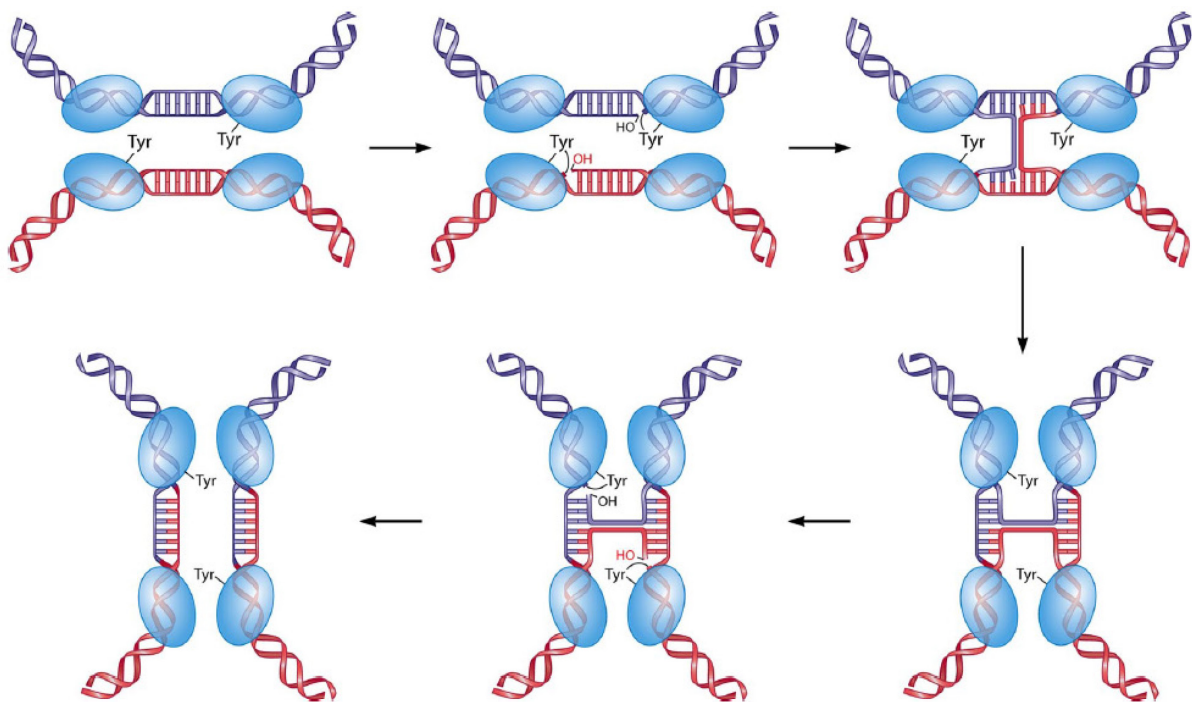


Abbildung 4: Rekombination durch Tyrosin-Rekombinasen. Vier Rekombinasen-Monomere (blaue ovale) binden an die Substrate; zwei der Monomere sind aktiv (gekennzeichnet durch das Tyrosin) und zwei sind inaktiv. Die aktiven Monomere schneiden die ersten DNA-Einzelstränge und bilden ein 3'-Phosphotyrosyl-Zwischenprodukt und eine freie 5'-OH-Gruppe. Es kommt zum Strangaustausch und der Ausbildung der Holliday- junction. Durch eine Konformationsänderung werden die anderen beiden Monomere aktiv und schneiden die anderen DNA-Stränge; die zweite Runde des Strangaustausches und der Ligation führt zur Vollendung der Rekombination (Rajeev et al., 2009).

Während die Rekombinasen Cre und Flp sehr einfache Erkennungsstellen aufweisen und sie alleine sowohl Integration als auch Exzision katalysieren können, ist bei den komplexeren Tyrosin-Integrasen die Richtung der Rekombinationsreaktion bezüglich Integration und Exzision streng kontrolliert, wobei die Entscheidung sowohl von zusätzlichen Proteinen als auch Bindungsstellen in der Substrat-DNA abhängig ist (Fogg et al., 2014). Die *attB*-Stelle für λ -Int besteht nur aus einer 20-30 bp langen DNA-Sequenz, die eine zu *attP* identische Kernsequenz flankiert von zwei „*inverted repeats*“ beinhaltet. Die *attP*-Stelle hingegen ist deutlich größer und beinhaltet neben der Kernsequenz sogenannte „*arm-type*“-Sequenzen. Diese weisen Bindungsstellen für die Integrase und weitere Faktoren, die an der Integration und Exzision beteiligt sind und als „*recombination directionality factor*“ (RDF) bezeichnet werden, auf (Biswas et al., 2005; Moitoso de Vargas et al., 1989; Ross and Landy, 1982). Einer dieser zusätzlichen Faktoren ist das durch den Wirt kodierte Protein IHF („*integration host factor*“). Durch die Bindung an die *attP* führt IHF eine Krümmung der DNA herbei, durch die die Bindungsstellen der Integrase in räumliche Nähe zueinander gebracht werden (Moitoso de Vargas et al., 1989; Nash, 1990; Segall et al., 1994). Für die Exzision des Prophagen aus dem Genom wird neben der Integrase und IHF auch das phagenkodierte Protein Xis benötigt. Zusammen bewirken sie die Rekombination der den Prophagen flankierenden Erkennungsstellen *attL* und *attR*. Am Ende der Exzisionsreaktion liegen wieder *attB* und *attP* vor.

1.5.2.2 Serin-Rekombinasen

Serin-Rekombinasen katalysieren die Rekombination zwischen relativ einfachen, typischer Weise ≤ 50 bp großen Erkennungsstellen (Brown et al., 2011; Thorpe et al., 2000). Sie binden als Dimere an *attP* und *attB*. Durch die Interaktion der Dimere kommt es zur Ausbildung eines Tetramers, bei dem die Rekombinationsstellen nah zueinander gebracht werden, wodurch ein synaptischer Komplex gebildet wird (Smith et al., 2004; Thorpe et al., 2000). In diesem Komplex werden die vier Rekombinasemonomere gleichzeitig aktiviert und dadurch zwei DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt (Fogg et al., 2014). Bei dieser Reaktion gehen die Rekombinasemonomere kovalente Bindungen mit den entstandenen 5'-Enden der DNA ein. Zudem erfolgt die Spaltungsreaktion versetzt, so dass es zur Ausbildung von 2 bp-langen 3'-Überhängen kommt (Reed and Grindley, 1981). Durch eine Rotation um 180° von zwei der DNA-gebundenen Rekombinasemonomere wird eine kreuzweise Verbindung der DNA-Stränge möglich (Grindley et al., 2006). Eine erfolgreiche Rekombination kann nur stattfinden, wenn die zentralen Basen der DNA-Stränge komplementär zueinander sind

(Ghosh et al., 2003; Grindley et al., 2006). Am Ende der Reaktion stehen zwei neu rekombinierte DNA-Moleküle. Die entgegengesetzte Exzisionsreaktion kann nur in Gegenwart eines phagekodierten RDFs stattfinden. Bekannte Vertreter der Serin-Rekombinasefamilie sind die Resolvasen $\gamma\delta$ und Tn3, sowie die Phagenintegrasen ϕ C31, R4 und TP901-1 (Groth and Calos, 2004).

1.5.3 Phagenbasierte Vektoren

Bereits Anfang der 1990er Jahre wurden die ersten Integrationsvektoren, die auf Phagenintegrasen basieren, für die Anwendung in verschiedenen Bakterienspezies beschrieben (Atlung et al., 1991; Lee et al., 1991; Martin et al., 1991). Diese Systeme bestehen entweder aus einem einzelnen Plasmid, auf dem neben dem Integrasegen und der *attP*-Stelle, ein Selektionsmarker sowie eine „multiple cloning site“ (MCS) enthalten sind, oder aus einem zwei-Plasmid-System, bei dem das *attP*-Stellen tragende Plasmid in eine Zelle eingebracht wird, die bereits ein Plasmid mit dem Integrasegen enthält. Solange das phagenkodierte *xis*-Gen nicht in den Vektoren enthalten ist, verbleiben diese stabil im Genom (Fogg et al., 2014). Diese stabile Integration der Vektoren, auch ohne Selektionsdruck, stellt einen der Vorteile der Integrationsvektoren dar. Außerdem ist das Einbringen der Gene im Vergleich zu anderen Methoden, wie der homologen Rekombination, ein relativ einfacher Prozess und bedarf weniger Zeit. Die eingebrachten Gene liegen im Gegensatz zur Verwendung von Plasmiden in einfacher Kopie vor, was für viele Versuche von Vorteil ist (Hoang et al., 2000; Lauer et al., 2002). Zudem können mehrere Phagenintegrasen-basierte Integrationsvektoren gleichzeitig im selben Organismus angewendet werden, ohne dass diese sich gegenseitig beeinflussen (Gregory et al., 2003). Solch phagenbasierte Vektoren können nicht nur für die genetische Manipulation von Bakterien, sondern auch für das Einbringen von Genen in Eukaryoten eingesetzt werden (Sauer et al., 1982; Schlake and Bode, 1994).

1.6 Genetische Manipulation von *Francisella*

Für die Untersuchung bakterieller Erreger ist die genetische Manipulation ein wichtiges Werkzeug, um Genfunktionen und damit zum Beispiel Stoffwechselwege oder Virulenzmechanismen genauer zu charakterisieren. Für die Forschung an Francisellen war die Isolierung des kryptischen Plasmides pFNL10 des Stammes *Fno* F6186 ein wichtiger Schritt, da zuvor keine in Francisellen replizierenden Plasmide bekannt waren (Pavlov et al., 1994). Das Plasmid pFNL10 kann sowohl in *Fno* als auch in *Ft* replizieren, allerdings nicht in

E. coli. Norqvist und Kollegen nutzen pFNL10 jedoch als Grundlage für die Entwicklung der ersten Shuttle-Vektoren für die Nutzung in *Francisella* (Norqvist et al., 1996). Seither wurden diese Shuttle-Vektoren stetig weiterentwickelt und die heutigen Vektoren verbleiben überwiegend stabil in den Bakterien auch ohne Selektionsdruck. Für manche Untersuchungen stellt die teilweise sehr hohe Kopienzahl dieser Vektoren jedoch ein Problem dar (LoVullo et al., 2009b; LoVullo et al., 2006; Maier et al., 2004; Pomerantsev et al., 2001). Die Entdeckung von Plasmiden in der Spezies *Fph* und deren Weiterentwicklung zu Vektoren erweitert das Repertoire an molekularen Werkzeugen und ermöglicht die Nutzung von mehreren Plasmiden pro Organismus (Le Pihive et al., 2009). Zudem wurden kürzlich weitere kryptische Plasmide und ein putatives Konjugationssystem beschrieben, die möglicher Weise für die Entwicklung weiterer Plasmidvektoren genutzt werden können (Challacombe et al., 2017b; Siddaramappa et al., 2014). Das Problem der hohen Kopienzahl kann durch die Nutzung von Vektoren, die in das Chromosom integrieren, umgangen werden. Diese auf Phagenintegrasen basierenden Vektoren werden wie unter 1.5.3 beschrieben in einer Vielzahl von Bakterien eingesetzt. Für Francisellen existieren jedoch nur wenige Systeme zur chromosomalen Integration. Während eines dieser Systeme nur für die Anwendung in der Spezies *Fno* geeignet ist (Ludu et al., 2008), ist mit den anderen beiden Systemen eine Anwendung in verschiedenen *Francisella*-Spezies möglich (LoVullo et al., 2009a). Die beschriebenen Systeme basieren entweder auf homologer Rekombination oder einem mini-Tn7-Vektor. Durch jedes der Verfahren entstehen Transformanten, die auch ohne Selektionsdruck stabil sind. Es werden jedoch mehrere Runden der Selektion oder Helferplasmide benötigt, um sie zu erzeugen (LoVullo et al., 2009a; Ludu et al., 2008). Da für *Francisella* bisher kein Bakteriophage beschrieben wurde, existieren auch keine für Francisellen spezifische Phagenintegrationsvektoren (LoVullo et al., 2009a; Rydzewski et al., 2015).

1.7 Der putative Phage von *Francisella hispaniensis*

Bis heute sind für *Francisella* keine natürlichen Phagen beschrieben. Bei Untersuchungen zu CRISPR/Cas-Systemen (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*/CRISPR-assoziiert) in verschiedenen *Francisella*-Spezies wurden jedoch vor Kurzem Spacer-Sequenzen gefunden, die mit Sequenzen der gleichen genomischen Region des Stammes *Fhis* AS02-814 korrelieren. Genauere Untersuchungen dieser Region führten zur Identifizierung einer GI mit einer Länge von 34.259 bp und 48 ORFs („open reading

frames“) (Schunder et al., 2013). Wie in Abbildung 5A gezeigt ist, weist ein Großteil der kodierten Proteine Homologien zu Phagenproteinen auf, so dass vermutet werden kann, dass FhaGI-1 für einen Phagen kodiert.

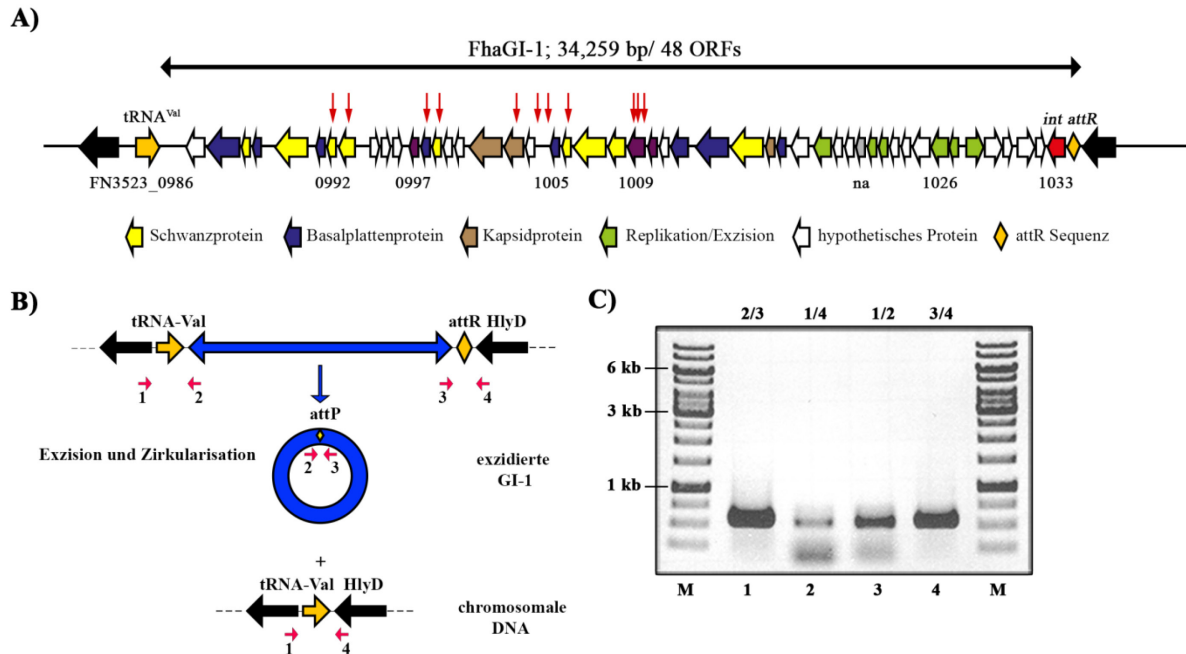


Abbildung 5: Organisation und Zirkularisation der genomischen Insel FhaGI-1 von Fhis AS02-814.

A) Aufbau und Organisation von FhaGI-1. Die GI liegt in das tRNA^{Val}-Gen (orangener Pfeil) integriert vor. Das 3'-Ende des tRNA-Gens, welches sequenzgleich mit der attR-Stelle ist, ist durch eine orangene Raute dargestellt. Die Gene, die für den putativen Prophagen kodieren, sind in den Farben gelb, grün, blau und braun dargestellt. Ein roter Pfeil steht für die ortsspezifische Integrase. Rote Pfeile über den Genen zeigen die Position identifizierter Spacer-Sequenzen an. B) Mechanismus der Bildung einer episomalen Form von FhaGI-1. Die chromosomale Form von FhaGI-1 (blauer Doppelpfeil) ist in die tRNA^{Val} (orangener Pfeil) integriert und wird auf der rechten Seite durch die attR-Stelle (orangene Raute) begrenzt. Rote Pfeile mit Ziffern stehen für Lokalisation und Orientierung spezifischer Primer. C) Detektion der episomalen Form (2/3) und der generierten chromosomalen DNA-Region (1/4) mittels PCR. Die Primerpaare 1/2 und 3/4 weisen die 3'- und 5'-Regionen der integrierten Form von FhaGI-1 nach (verändert nach Niehaus, 2014; Schunder et al., 2013).

Die putative Phageninsel ist in das tRNA^{Val}-Gen, das zwischen den Genen FN3523_0985 und FN3523_0986 lokalisiert ist, integriert. Die korrespondierende attR-Stelle (Repeat-1) befindet sich zwischen den Genen FN3523_1033 und FN3523_1034. Das Gen FN3523_1033 kodiert für eine ortsspezifische Integrase und weist eine Homologie von 31% zu dem Gen Lpc2818, das für die Integrase der GI Trb-1 des Stammes *Legionella pneumophila* Corby kodiert, auf. Dies führte zu der Vermutung, dass FhaGI-1, genau wie Trb-1, eine episomale, zirkuläre Form bilden könnte, die dann auf andere Stämme übertragen werden könnte (Glöckner et al.,

2008; Lautner et al., 2013; Schunder et al., 2013). Im Rahmen weiterführender Untersuchungen konnten durch PCR-Analysen chromosomaler DNA des Stammes *Fhis* AS02-814 sowohl die zirkuläre episomale Form, als auch die dadurch generierte chromosomale DNA-Region nachgewiesen werden (Abbildung 5C, Spuren 2/3 und 1/4). Auch die 3'- und 5'-Regionen der integrierten Form der GI konnten durch die Primerpaare nachgewiesen werden (Abbildung 5C, Spuren 1/2 und 3/4). Dies zeigte, dass es sich bei FhaGI-1 tatsächlich um eine funktionale GI handelt (Niehaus, 2014; Rydzewski et al., 2015).

1.8 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die genauere Charakterisierung der genomischen Insel FhaGI-1 des Stammes *Fhis* AS02-814. Dafür sollte die Rolle der in der Genominsel identifizierten Integrase bei der Bildung der episomalen Form sowie bei der Integration in das Genom überprüft werden und auch, ob dieser Vorgang ortsspezifisch abläuft. Weiterhin von Interesse war die Frage, ob FhaGI-1 auf andere *Francisella*-Spezies übertragbar ist und in den Transformanden stabil verbleibt. Da der Stamm *Fhis* AS02-814 nicht für Untersuchungen zur Verfügung stand, sollten synthetisch verkürzte Varianten der GI, bei denen die für Phagenpartikel kodierenden Gene fehlen, hergestellt und für die Versuche eingesetzt werden. Mit diesen synthetischen Konstrukten sollte auch die Übertragbarkeit auf andere Spezies untersucht werden. Außerdem sollte durch weitere synthetische Konstrukte, bei denen bestimmte Elemente wie die Integrase und das Repeat durch analoge Teile der nicht-funktionalen GI FphGI-1 der Spezies *Fph* ausgetauscht werden, die Rolle dieser beiden Elemente tiefergehend beleuchtet werden.

Eine auf verschiedene *Francisella*-Spezies übertragbare Genominsel, die in das Genom integriert und stabil in den Transformanden verbleibt, könnte als Integrationsvektor genutzt werden. Um zu überprüfen, ob sich FhaGI-1 als Grundlage für einen ortsspezifischen Integrationsvektor eignet, sollte ein solcher Integrationsvektor konstruiert werden. Anschließend sollten Transformanden auf das Vorhandensein der episomalen Form sowie die Stabilität des Vektors untersucht werden. Es sollte außerdem überprüft werden, ob Gene wie das Reportergen *gfp* zur Expression gebracht werden können. Weiterführend sollte die Möglichkeit zur chromosomalen/ episomalen Komplementation von Mutanten analysiert werden.

Auf FhaGI-1 wurden Gene identifiziert, die für einen putativ funktionalen Prophagen kodieren. Es sollten Untersuchungen durchgeführt werden, um festzustellen, ob FhaGI-1 tatsächlich ein funktionaler Prophage ist. Hierfür sollte die gesamte GI synthetisiert und die rekombinante Insel in *Francisella* kloniert werden. Die Transformanten sollten auf das Vorhandensein von Phagenpartikeln analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

2.1.1.1 *Francisella*

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete bzw. generierte *Francisella*-Stämme.

Bakterienstamm	Charakteristika	Referenz
<i>Francisella tularensis</i> <i>holarctica</i> (<i>Fth</i>) LVS	Impfstamm	ATCC 29684
<i>Fth</i> LVS FhaGI-1_Reg	<i>Fth</i> LVS mit FhaGI-1_Reg inseriert in die tRNA ^{Val} , KmR	diese Arbeit
<i>Fth</i> LVS FhaGI-1_Int	<i>Fth</i> LVS mit FhaGI-1_Int inseriert in die tRNA ^{Val} , KmR	diese Arbeit
<i>Fth</i> LVS FhaGI-1_ΔInt	<i>Fth</i> LVS mit FhaGI-1_ΔInt inseriert in die tRNA ^{Val} , KmR	diese Arbeit
<i>Fth</i> LVS FhaGI-1_Int _{Fph}	<i>Fth</i> LVS mit FhaGI-1_Int _{Fph} inseriert in die tRNA ^{Val} , KmR	diese Arbeit
<i>Fth</i> LVS FhaGI-1_attRL	<i>Fth</i> LVS mit FhaGI-1_attRL inseriert in die tRNA ^{Val} , KmR	diese Arbeit
<i>Fth</i> LVS FhaGI-1_Reg-attR _{Fph}	<i>Fth</i> LVS mit FhaGI-1_Reg-attR _{Fph} inseriert in die tRNA ^{Val} , KmR	diese Arbeit
<i>Fth</i> LVS FhaGI-gfp-CmR	<i>Fth</i> LVS mit FhaGI-gfp-CmR inseriert in der tRNA ^{Val} , CmR	diese Arbeit
<i>Fth</i> LVS FIV1-Val	<i>Fth</i> LVS mit FIV1-Val inseriert in die tRNA ^{Val} , CmR	diese Arbeit
<i>Fth</i> LVS Δ <i>iglC</i>	<i>iglC</i> -Deletionsmutante, keine intrazelluläre Vermehrung	Golovliov et al., 2003
<i>Fth</i> LVS Δ <i>iglC</i> FIV1- <i>iglC</i>	Mutante komplementiert mit FIV1-Val <i>iglC</i> , CmR	diese Arbeit
<i>Fth</i> LVS FIV1-Valgfp	<i>Fth</i> LVS mit FIV1-Valgfp inseriert in die tRNA ^{Val} , CmR	diese Arbeit

<i>Fth</i> LVS FIV2-Val	<i>Fth</i> LVS mit FIV2-Val inseriert in die tRNA ^{Val} , CmR	diese Arbeit
<i>Fth</i> LVS FIV3-Val	<i>Fth</i> LVS mit FIV3-Val inseriert in die tRNA ^{Val} , CmR	diese Arbeit
<i>Francisella novicida</i> (Fno) U112	Wildtyp	ATCC 15482
<i>Fno</i> U112 FIV1-Val	<i>Fno</i> U112 mit FIV1-Val inseriert in die tRNA ^{Val} , CmR	diese Arbeit
<i>Fno</i> Fx1	Wildtyp	FSC 156
<i>Fno</i> Fx1 FIV1-Val	<i>Fno</i> Fx1 mit FIV1-Val inseriert in die tRNA ^{Val} , CmR	diese Arbeit
<i>Francisella philomiragia</i> (Fph) ATCC 25016	Wildtyp	ATCC 25016
<i>Fph</i> ATCC 25018	Wildtyp	ATCC 25018
<i>Francisella</i> sp. W12-1067	Umweltisolat aus einem Kühlturm	Rydzewski et al., 2014
<i>Francisella</i> sp. W12-1067 FIV1-Val	W12-1067 mit FIV1-Val inseriert in die tRNA ^{Val} , CmR	Tlapák et al., 2018
<i>Francisella</i> sp. W12-1067 FIV2-Val	W12-1067 mit FIV2-Val inseriert in die tRNA ^{Val} , CmR	Rydzewski et al., 2015
<i>Francisella</i> sp. W12-1067 +GI-2	<i>Francisella</i> W12-1067 mit FhaGI-2 inseriert in die tRNA ^{Val} , KmR	diese Arbeit

2.1.1.2 *Escherichia coli*

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme.

Bakterienstamm	Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	F-, Ω80 <i>dlacZ</i> Δ15, Δ(<i>argF lac</i>), U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (rk-, mk-), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA69</i> , <i>relA1λ</i> -	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> OneShot Top10 cells	F-, <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>araleu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (StrR), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen

2.1.2 Genome

Tabelle 3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Genomsequenzen.

Bakterienstamm	Referenznummer Genom (GenBank)
<i>Fhis</i> AS02-814	CP002558.1
<i>Fno</i> DPG 3A-IS (früher <i>Ftt</i> W96)	CP010103
<i>Fno</i> FAI DR83	J00T01000024 (Contig 75)
<i>Fno</i> Fx1	CP002557.1
<i>Fno</i> U112	CP000439.1
<i>Fph</i> ATCC 25015	DS9999316.1
<i>Fph</i> ATCC 25016 (O#319-029)	CP009343
<i>Fph</i> ATCC 25017 [#]	CP009442.1
<i>Fph</i> ATCC 25017 ^{**}	CP000937
<i>Fph</i> ATCC 25018 (O#319-067)	CP009436
<i>Fph</i> GA01-2801	CP009444.1
<i>Fph</i> TX077308	CP002872
<i>Fth</i> LVS	AM233362.1

2.1.3 Oligonukleotide

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Name	T _m [°C]	Sequenz (5'→ 3') (bp)	Referenz
Überprüfung der FIV-Val-Integrationsvektoren:			
Fha-1	61,9	aatcactccaatagccagtactaagga (27)	Niehaus, 2014
Fha-1 ^{W12}	58,9	cttgcttcaatgactgggttttg (23)	Tlapák et al., 2018
Fha-2	61,6	cttgtcaacaactgggtactttctc (26)	Niehaus, 2014
Fha-2*	62,7	ctatcaggacatagcgttggtac (24)	diese Arbeit*

Fha-2**	60,1	attagcaatgagcttagcttggtgct (26)	diese Arbeit [#]
SacB_R_out	58,9	ctacgcagacaaacaatcaacgt (23)	diese Arbeit [#]
Fha-3*	59,3	ctgagaattaagccacttatatcagaat (28)	Niehaus, 2014
Fha-3 ^{Fph}	62,2	caactcttaatacacgccctaaagtgtc (28)	diese Arbeit
Fha-3Cm	59,8	agctcacctgtcttcattgcc (20 bp)	diese Arbeit
Fha-4*	63,4	gtaaaacccgttggtcaaccttatcag (27)	diese Arbeit*
Fha-4 ^{W12}	58,9	atccaggaatctttgtaggagct (23)	Tlapák et al., 2018
Fha-4Int	59,4	cctgtgttgagcctgtacca (20)	diese Arbeit
M13U (Fha-1 ^P)	52,8	gtaaaacgacggccagt (17)	O'Shaughnessy et al., 2003
M13R (Fha-4 ^P)	54,5	ggaaacagctatgacctg (19)	O'Shaughnessy et al., 2003
iglC_U	58,4	actccgatcttactatgcagct (22)	diese Arbeit [#]
iglC_R	57,3	gcgagaccattcatgtgaga (20)	diese Arbeit [#]
gfp F	59,4	ctacctgttccatggccaac (20)	diese Arbeit
gfp R	57,3	Aaagggcagattgtgtggac (20)	diese Arbeit
Fha_Int_U	57,1	acactattggcaaactaggatca (23 bp)	diese Arbeit
Fha_Int_R	55,9	tgcgtagttttcacatctgca (21 bp)	diese Arbeit
Realtime-PCR			
RT-FIV-CmR-U	60,3	gaaagacggtgagctggtgata (22)	diese Arbeit [#]
RT-FIV-CmR-R	60,3	gtgtagaaactgccggaaatcg (22)	diese Arbeit [#]
RT-FIV-CmR-TM	64,6	FAM-catcgctctggagtgaataccacga-BHQ-1 (25)	diese Arbeit [#]
Ft-fopA-F	57,9	ttgggcaaacttagcaggtca (21)	Schulze et al., 2016

Ft-fopA-R	60,1	atctgtagtcaacacttgcttgaaca (26)	Schulze et al., 2016
Ft-fopA-TM	64,6	FAM- aagaccaccaccaacatcccaagca-BHQ-1 (25)	Schulze et al., 2016
Überprüfung von FphGI-1:			
FPhGI-1	57,1	gcttgctagatgagagtaaatac (23)	diese Arbeit*
FPhGI-2	57,1	tctcgaagttcagcacttagttt (23)	diese Arbeit*
FPhGI-3	57,1	agctaacgcaactagagttatct (23)	diese Arbeit*
FPhGI-4	57,1	ttgcatagatgtgaagcaagggt (23)	diese Arbeit*
Klonierung von FhaGI-1			
Phage_KO_1U	61,3	catagagtctgaatagatgcgctca (25 bp)	diese Arbeit
Phage_KO_2R	60,4	gaacagatttaggtattgactctcaga (27 bp)	diese Arbeit
Phage_F2_out_U	57,6	tagccatacgaagcttgacattat (24 bp)	diese Arbeit
Phage_F3_out_R	57,6	acatacgatgactcattagaagca (24 bp)	diese Arbeit
Phage_Km_KO_R	59,4	cctgaatgaactgcaggacg (20 bp)	diese Arbeit
Phage_F1_out_U	58,9	tgcgcgacacagaataatatctc (23 bp)	diese Arbeit
Phage_F2_out_R	58,9	ctgttgattttctacagtcgct (23 bp)	diese Arbeit
Phage F	54,9	atcttcaagatataaatcaatataagag (28)	Radomski, 2013
Phage R	59,3	gctttatcggaatatatgcaagtttga (28)	Radomski, 2013
gfp_out_U	60,6	ctccagtgaaaagttcttctccc (23)	diese Arbeit
gfp_out_R	60,3	gtaacagctgctgggattacac (22)	diese Arbeit
GI-1U Cm_neu	58,4	ccaagcacaccttgagatagtt (22 bp)	diese Arbeit
GI-1R_Cm	59,4	cacactgcttccggtagtc (20 bp)	diese Arbeit

FhaGI-attR-F	69,5	gtttttagcggccgctcaaggtgcc (27 bp)	diese Arbeit
FhaGI-attR-R	72,6	cccgacactgcgccgcaaaactctctc (27 bp)	diese Arbeit
GI1-attR_R	55,9	tcagtttgggttttaaatccttgt (24 bp)	diese Arbeit

*, veröffentlicht in Rydzewski et al., 2015; #, veröffentlicht in Tlapák et al., 2018

2.1.4 Vektoren

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete bzw. generierte Vektoren.

Name	Charakteristika	Referenz
pBCSK+	Klonierungsvektor, <i>lacZ</i> -Gen, T3- und T7-Promotor, pMB1 ori, CmR, 3400 bp	Stratagene
pFhaGI-gfp-CmR	<i>Francisella</i> -Integrationsvektor; tRNA ^{Val} , <i>gfp</i> -Gen, GroES-Promotor, PRE*, CmR, Gen FN3523_1033 (Integrase) und <i>attR</i> -Stelle von FhaGI-1 (4644 bp) in pUC57-KANA, pMB1 ori, CmR, KmR, 7681 bp	diese Arbeit*
pFIV1-Val	<i>Francisella</i> -Integrationsvektor nach Klonierung von <i>FhaGI-MCS-Neu</i> in pFhaGI-gfp-CmR (SacII/SnaBI), pMB1 ori, CmR, KmR, 7706 bp	diese Arbeit
pFIV2-Val	<i>Francisella</i> -Integrationsvektor nach Klonierung von <i>SacB-tRNA-MCS</i> in pFIV1-Val (EcoRI/KpnI), pMB1 ori, CmR, KmR, 9014 bp	diese Arbeit
pFIV3-Val	<i>Francisella</i> -Integrationsvektor nach Klonierung von <i>fürFIV3-Val</i> in pFIV2-Val (ApaI/NheI), pMB1 ori, CmR, KmR, 9314 bp	diese Arbeit
pGEM®-T Easy	TA-Klonierungsvektor, <i>lacZ</i> -Gen, T7-Promotor, AmpR, 3015 bp	Promega GmbH

Der mit * gekennzeichnete Vektor wurde von der Firma GeneCust synthetisiert.

2.1.5 Plasmide

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete bzw. generierte rekombinante Plasmide.

Name	Charakteristika	Referenz
pFhaGI-1_Reg	tRNA ^{Val} , Gene FN3523_1026-1033 FhaGI-1 und <i>attR</i> -Stelle von FhaGI-1, KmR (7787 bp) in pUC57, AmpR	diese Arbeit*

pFhaGI-1_Int	tRNA ^{Val} , Gen FN3523_1033 (Integrase) und <i>attR</i> -Stelle von FhaGI-1, KmR (3292 bp) in pUC57, AmpR	diese Arbeit*
pFhaGI-1_ΔInt	tRNA ^{Val} , Gene FN3523_1026-1032 und <i>attR</i> -Stelle von FhaGI-1, KmR (6767 bp) in pUC57, AmpR	diese Arbeit*
pFhaGI-1_Int _{Fph}	tRNA ^{Val} , Gen Fpi_1821 (Integrase von FPhGI-1) und <i>attR</i> -Stelle von FhaGI-1, KmR (3270 bp) in pUC57, AmpR	diese Arbeit*
pFhaGI-1_attRL	<i>attL/R</i> -Stellens von FhaGI-1, KmR (2124 bp) in pUC57, AmpR	diese Arbeit*
pFhaGI-1_Reg- attR _{Fph}	tRNA ^{Val} , Gene FN3523_1026-1033 von FhaGI-1, <i>attR</i> -Stelle von FphGI-1, KmR (7787 bp) in pUC57, AmpR	diese Arbeit*
pFhaGI-MCS-Neu	tRNA ^{Val} , MCS1, <i>gfp</i> , MCS2, PrGroES, PRE, PrGroES ^{W12} , CmR (2389 bp) in pUC57, AmpR	diese Arbeit*
pSacB-tRNA-MCS3	<i>SacB</i> -gen aus <i>Bacillus subtilis</i> , tRNA ^{Val} , MCS3 (2502 bp) in pUC57, AmpR	diese Arbeit*
pfürFIV3-Val	CmR, <i>attR</i> -Stelle, Integrase, P_0953 (3234 bp) in pUC57, AmpR	diese Arbeit*
pPrFTL-0953-GFP	<i>gfp</i> -Gen mit Promotor FTL0953 (1048 bp) in pUC57, AmpR	diese Arbeit*
pFIV1-Valgfp	pFIV1-Val mit <i>gfp</i> -Gen und Promotor aus pPrFTL-0953-GFP, BclI/AatII kloniert, CmR, KmR	diese Arbeit
pFTN-iglC-Pr	<i>iglC</i> -Gen aus <i>Fth</i> (1262 bp) in pUC57, AmpR	diese Arbeit*
pFIV1-Val iglC	pFIV1-Val mit <i>iglC</i> -Gen aus pFTN-iglC-Pr, SacI/NheI kloniert	diese Arbeit
pFhis3523-GI-1	1. Hälfte des putativen Phagen von FhaGI-1 (Gene FN3523_0986-1010) mit <i>gfp</i> -Gen in pET-28, KmR	diese Arbeit*
pFhis3523-GI-2 F1	Fragment 1 der 2. Hälfte des putativen Phagen von FhaGI-1 mit KmR (4635 bp) in pUC57, AmpR, KmR	diese Arbeit*
pFhis3523-GI-2 F2	Fragment 2 der 2. Hälfte des putativen Phagen von FhaGI-1(6345 bp) in pUC57, AmpR	diese Arbeit*
pFhis3523-GI-2 F3	Fragment 3 der 2. Hälfte des putativen Phagen von FhaGI-1 (1802 bp) in pUC57, AmpR	diese Arbeit*
pFhis3523-GI-2 F4	Fragment 4 der 2. Hälfte des putativen Phagen von	diese Arbeit*

	FhaGI-1 (5744 bp) in pBlueskript II SK+, AmpR	
pFhis3523-GI-2 F4B	Fragment 4 der 2. Hälfte des putativen Phagen von FhaGI-1 in pBCSK+, CmR	diese Arbeit
pFhis3523-GI-2 F5	Ligationsprodukt von F2+F3+F4B, in pUC57, AmpR	diese Arbeit
pFhis3523-GI-2	vollständige 2. Hälfte des putativen Phagen von FhaGI-1 (Gene FN3523_1011-1033) mit KmR in pUC57, AmpR, KmR	diese Arbeit
pFhisGI-1Cm	1. Hälfte des putativen Phagen von FhaGI-1 mit CmR inseriert (SmaI) in der KmR, CmR	diese Arbeit
pGemTeasy_attR	pGEM-T Easy Vektor mit <i>attR</i> -Stelle von FhaGI-1 in MCS, kann mit NotI ausgeschnitten werden, AmpR	diese Arbeit

Die mit * gekennzeichneten rekombinanten Plasmide wurden von der Firma GeneCust synthetisiert.

2.1.6 Zusätze zu Nährmedien

In Tabelle 7 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotikazusätze aufgeführt. Bei Bedarf wurden zu HCA-Agar zusätzlich 5 % Sucrose zugesetzt.

Tabelle 7: Verwendete Antibiotikazusätze für Nährmedien.

Antibiotikum (Lösungsmittel)	<i>Francisella</i> [µg/ml]		<i>E. coli</i> [µg/ml]	
	Agar	flüssig	Agar	flüssig
Ampicillin, Amp (H ₂ O)	/	/	100	100
Chloramphenicol, Cm (Ethanol)	10	8	40	40
Kanamycin, Km (H ₂ O)	12	5	40	40

2.1.7 Verwendete Kits

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Kits

Name	Hersteller
Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Stratec Molecular GmbH
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen GmbH

Wizard® Plus SV Gel and PCR
Clean-Up System

Promega GmbH

2.1.8 Verwendete Enzyme

Tabelle 9: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme.

Bezeichnung	Charakteristika	Hersteller
Top-Taq	DNA-Polymerase	Qiagen GmbH
KAPA HiFi HotStart	DNA-Polymerase	Kapa Biosystems
AatII	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs
ApaI	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs
BbsI	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs
BclI	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs
BsmBI	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs
EcoRI	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs
KpnI	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs
NheI	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs
NotI	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs
SacI	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs
SacII	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs
SalI	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs
SmaI	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs
SnaBI	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs
Antarktische Phosphatase	Phosphatase	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase	DNA-Ligase	New England Biolabs

2.1.9 Größenstandards

2.1.9.1 DNA-Größenstandard

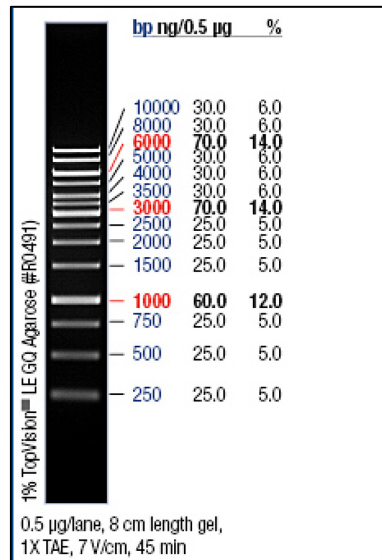


Abbildung 6: In dieser Arbeit verwendeter DNA-Größenstandard. Die Bestimmung der Größe von DNA Fragmenten erfolgte mit der „GeneRuler 1kb DNA-Ladder“, ThermoFisher. Auf ein 0,9%-iges Gel wurden 10 µl des Größenstandards aufgetragen.

2.1.9.2 Protein-Größenstandard

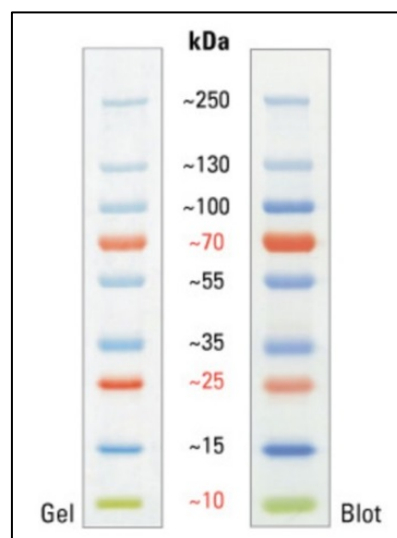


Abbildung 7: In dieser Arbeit verwendeter Protein-Größenstandard. Zur Bestimmung der Größe von Proteinen in SDS-Gelen wurde die „PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder“ eingesetzt. Es wurden 3 µl Größenstandard aufgetragen.

2.1.10 Geräteliste

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	1000 l	Webeco
Agarosegeldokumentation	Fas Digi Geldokumentationssystem	Nippon Genetics
Bakterienplattierer	Whitley Spiralplater	dw Scientific
Brutschrank (37°C)	Incudrive S	Heraeus Holding GmbH
Brutschrank (37°C, 5%CO ₂)	C150	Binder
Eismaschine	AF-80	Scotsman
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 40 CFL	Carl- Zeiss
Feinwaage	PLJ 600-3NM	Kern
Gefrierschrank (-20°C)	Pro Comfort	Privileg
Gefrierschrank (-80°C)	MDF-U53V	Sanyo
Grobwaage	470	Kern
Heizblock	Bio TDB-100	Biosan
Kühlschrank	Bio	Privileg
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf
Kühlzentrifuge	Heraeus Multifuge 1L-R	Thermo Scientific
Lichtmikroskop	Wilovert 30	Helmut Hund GmbH
Magnetrührer	L-81	Labinco

pH-Meter	FE20-FiveEasy	Mettler Toledo
Photometer	Genesys 10 Bio	Thermo Scientific
Pipetten	Eppendorf Research	Eppendorf
Pipettierhilfe	accu-jet pro	Brand
Protein- Elektrophoreseapparatur	Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad
Real-Time PCR System	ABI 7500	Applied Biosystems
Schüttelinkubator	TH30	Endmund Bühler GmbH
Sterilwerkbank	Herasafe KS	Thermo Scientific
Thermocycler	T3000	Biometra
Thermoschüttler	Comfort	Eppendorf
Vortex	VTX-3000L	LMS
Zentrifuge	Centrifuge 5424	Eppendorf

2.1.11 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien von folgenden Herstellern bezogen:

Applied Biosystems (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt); Bio Rad (München), Dianova (Hamburg), Eurofins MWF Operon (Ebersberg), Fermentas (ST. Leon-Rot), Gerbu (Gaiberg), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), New England BioLabs (Frankfurt am Main), Oxoid (Wesel), PAA Laboratories (Cölbe), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München), Thermo Scientific (Bonn), VMR International (Nürnberg)

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterien

2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli wurden entweder auf LB- Agar bei 37°C inkubiert oder in LB- Flüssigmedium bei 37°C und 225 rpm angezogen. Bei Bedarf wurden dem Medium Antibiotika zugesetzt (siehe Tabelle 7).

LB-Flüssigmedium:

Bacto Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g

In 1000 ml H₂O_d lösen und autoklavieren.

LB-Agar:

Bacto Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar	12 g

In 1000 ml H₂O_d lösen und autoklavieren.

2.2.1.2 Kultivierung von *Francisella*

Francisellen wurden entweder auf HCA- Agar (enriched Heart Cystein agar) für 1-3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ oder in MediumT bei 37°C und 225 rpm kultiviert. Wenn notwendig wurde das Medium mit Antibiotika oder anderen Zusätzen supplementiert (siehe Kapitel 2.1.6)

MediumT:

Brain Heart Infusion	10 g
Bacto Trypton	10 g
technische Kasaminosäuren	10 g

In 1000 ml H₂O_d lösen und für 30 min bei 110°C autoklavieren
50 ml Salze zu 1000 ml Mediumbasis geben

Salze:	MgSO ₄	0,1 g
	FeSO ₄	0,2 g
	NaCitrat	2,4 g
	KCl	0,4 g
	K ₂ HPO ₄	0,8 g
	L-Cystein	1,2 g
	Glucose	30 g

In 100 ml H₂O_d lösen und 20 min bei 100°C im Wasserbad inkubieren.

HCA-Agar: HCA-Agar (Liofilchem) 51 g

In 900 ml H₂O_d lösen, den pH-Wert auf pH 6,6-7,0 einstellen und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. Anschließend bei 121°C für 15 min autoklavieren.

Auf 45°C abkühlen lassen und 100 ml Schafblut dazugeben.

2.2.1.3 Konservierung von Bakterien

E. coli wurden für die langfristige Lagerung über Nacht auf LB-Agar angezogen, anschließend mit einer Impföse abgenommen und in 20% Glycerin resuspendiert. Francisellen wurden 1-3 Tage (je nach Stamm) auf HCA-Agar kultiviert und anschließend mit einer Impföse abgenommen und in 20% Glycerin überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Für einige *Francisella*-Stämme war die Lagerung in 10% Glycerin erforderlich.

2.2.2 Kultivierung von U937-Zellen

Die Kultivierung von U937-Zellen erfolgte in 25 cm²- Zellkulturflaschen (NuncEasyFlask™ Nucleon™, ThermoScientific) in RPMI 1640-Medium mit 10% FKS bei 37°C und 5% CO₂. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen passagiert, indem sie in frischem RPMI 1640-Medium mit 10% FKS 1:10 verdünnt wurden.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

2.2.3.1 Bestimmung der Zellzahl nach Neubauer

Nach dem Ablösen von U937- Zellen vom Flaschenboden wurden die Zellen in 50 ml RPMI+10% FKS aufgenommen und 100 µl dieser Zellsuspension mit 100 µl Trypanblau gemischt, um tote Zellen anzufärben. 15 µl dieses Gemischs wurden in eine Zählkammer

nach Neubauer (C-Chip Neubauer improved DHC N01, DigitalBio) gegeben und die Zellzahl bestimmt. Es wurden 8 Großquadrate ausgezählt, der Durchschnittswert gebildet und dieser mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor (10^4) multipliziert.

2.2.3.2 Bestimmung der Lebendzellzahl mit dem Spiralplater

Bei Infektionsversuchen und der Testung der Stabilität der FIV-Val-Vektoren wurde die Zellzahl der *Francisella*-Kulturen mit Hilfe des Whitley Spiralplaters bestimmt. Dabei plattiert der Plater 50 µl Bakteriensuspension in logarithmisch abnehmender Konzentration auf HCA-Agar aus. Nach 1-3 tägiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde die Anzahl der Kolonien jeder Platte mit dem Koloniezähler bestimmt und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten („colony forming units“=CFU) je Milliliter berechnet.

2.2.3.3 Photometrische Bestimmung der Zellzahl

Bei *Francisella*-Flüssigkulturen wurde die Zellzahl mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 1 ml Kultur wurde gemessen. Eine optische Dichte von OD₆₀₀= 1,0 entsprach hierbei ungefähr einer Zellzahl von 1×10^9 Zellen/ml.

2.2.4 Nukleinsäuretechniken

2.2.4.1 Synthetisch hergestellte Konstrukte

Es wurden für verschiedene Zwecke Konstrukte synthetisiert und mittels *in vitro* DNA-Synthese hergestellt. Die Überprüfung der DNA-Sequenzen durch DNA-Sequenzierung sowie die Klonierung der verschiedenen DNA-Fragmente in die multiple cloning site (MCS) geeigneter Vektoren erfolgte durch die Firma GeneCust (GeneCust, Dudelange, Luxemburg).

2.2.4.1.1 Konstruktion verkürzter Varianten von FhaGI-1

Verschiedene verkürzte Varianten der GI FhaGI-1 wurden für die Untersuchung der Funktionalität der GI konstruiert und lagen im Vektor pUC57vor. (1) **FhaGI-1_Reg** (7787 bp) besteht aus 167 bp an DNA, die vor FhaGI-1 lokalisiert sind, 258 bp der 5'-Region von FhaGI-1 inklusive des tRNA^{Val}-Gens, gefolgt von dem Promotor *groEL* mit der Kanamycinresistenzkassette (KmR) (1288 bp) des Plasmids pKK289KmGFP (Bönquist et al., 2008), 5918 bp der 3' DNA der GI, der *attR*-Stelle (47 bp) und 109 bp chromosomaler DNA,

die hinter FhaGI-1 lokalisiert sind. Die putativ für einen Prophagen kodierenden Gene FN3523_0986 bis FN3523_1025 wurden nicht in das Konstrukt aufgenommen. (2) **FhaGI-1_Reg-ΔInt** ist identisch zu FhaGI_Reg aufgebaut, bis auf eine 1020 bp lange Deletion innerhalb des Integrasegens (FN3523_1033). (3) **FhaGI-1_Int** besteht aus 167 bp DNA, die vor FhaGI-1 lokalisiert sind, 258 bp der 5'-Region von FhaGI-1 inklusive des tRNA^{Val}-Gens, gefolgt vom Promotor *groEL* mit KmR, dem Integrasegen (FN3523_1033), der *attR*-Stelle und 109 bp chromosomaler DNA, die hinter FhaGI-1 lokalisiert sind. (4) **FhaGI-1_Reg-attR_{Fph}** ist identisch zu FhaGI-1_Reg aufgebaut, außer dass die *attR*-Stelle durch Repeat-1* des Stammes *Fph* ATCC 25017 ausgetauscht wurde. (5) **FhaGI-1_Int_{Fph}** entspricht in seinem Aufbau FhaGI-1_Int, jedoch wurde das Integrasegen durch das des Stammes *Fph* ATCC 25017 (*Fphi*_1821) ersetzt. (6) **FhaGI-1_attRL** besteht aus 167 bp DNA, die vor FhaGI-1 lokalisiert sind, 258 bp der 5'-Region von FhaGI-1 inklusive des tRNA^{Val}-Gens, gefolgt vom Promotor *groEL* mit KmR der *attR*-Stelle und 109 bp chromosomaler DNA, die hinter FhaGI-1 lokalisiert sind.

2.2.4.1.2 Konstruktion der Integrationsvektoren

Es wurden vier verschiedene Konstrukte hergestellt um die pFIV-Val Vektoren zu generieren. Als Vektorrückgrat diente der Vektor pUC57-Kana. (1) **FhaGI-gfp-CmR** (4644 bp) besteht aus dem tRNA^{Val}-Gen von FhaGI-1, gefolgt von Restriktionsschnittstellen für NotI, BclI und SnaBI, dem *gfp*-Gen mit Promotor des Vektors pKK289KmGFP (Bönquist et al., 2008), Restriktionsschnittstellen für NotI und SacI, dem Promotor GroES des Stammes *Fth* LVS (pGroES) (Ericsson et al., 1997), dem *igla*-Promotor mit dem PigR response element (PRE, unterstrichene Basen in PRE*), (PRE*: AGCTGTAATAA ACATTGTGTT ATTGGCGTTA TTAAGGTAAC TT) (Ramsey et al., 2015), dem GroES-Promotor des Stammes *Francisella* sp. W12-1067 (Rydzewski et al., 2014), gefolgt von einer Chloramphenicolresistenzkassette (CmR) (952 bp) mit dem Promotor GroES des Vektors pKK289KmGFP (Bönquist et al., 2008), dem Integrasegen von FhaGI-1 (FN3523_1033) und der Phagenintegrationsstelle *attR* (47 bp). Die PRE*-Stelle wurde in den pFIV-Val Vektor aufgenommen, um einen Promotor einzuführen, der während der intrazellulären Replikation von *Francisella* aktiv sein sollte.

(2) **MCS-Neu** (2389 bp) ist identisch mit der Sequenz von FhaGI-gfp-CmR bis auf die Restriktionsschnittstellen, die das *gfp*-Gen umgeben. Diese wurden erweitert und MCS1 mit Schnittstellen für NotI, BclI, SacI und AatII, sowie MCS2 mit Schnittstellen für KpnI, EcoRV,

NotI und NcoI genannt. (3) **SacB-tRNA-MCS3** (2502 bp) besteht aus dem vollständigen *sacB*-Gen (2007 bp) von *Bacillus subtilis* (Steinmetz et al., 1985), dem tRNA^{Val}-Gen und einer einzigen MCS mit Restriktionsschnittstellen für BclI, SacI, AatII, KpnI, EcoRV, NotI und NcoI. (4) **fürFIV3** (3234 bp) besteht aus der CmR (952 bp) mit dem Promotor GroES des Vektors pKK289KmGFP (Bönquist et al., 2008), der *attR*-Stelle und dem Integrasegen von FhaGI-1 (FN3523_1033) gefolgt von dem Promotor des Gens FTL_0953 (P_0953) (Bent et al., 2013).

2.2.4.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *Francisella*

Für die Isolierung chromosomaler DNA wurden Francisellen über Nacht in MediumT kultiviert und anschließend aus 0,5-1 ml Zellsuspension die DNA mit Hilfe des Blood&Tissue Kits (Qiagen) wie vom Hersteller beschrieben isoliert. Die chromosomale DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.4.3 Isolierung von Plasmid- DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid- DNA erfolgte mit Hilfe des Invidorb® Spin Plasmid Mini Two Kits von Stratec wie vom Hersteller beschrieben. Für gewöhnlich erfolgte die Isolierung aus 2 ml Übernachtskultur. Abweichend zu der Anleitung des Herstellers erfolgte die Elution der DNA in 50 µl H₂O_{dd}. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Plasmid-DNA bei -20°C gelagert.

2.2.4.4 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau von DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen der Firma NewEngland Biolabs nach Anleitung durchgeführt. Ein 50 µl Ansatz für einen Verdau mit zwei Enzymen sah gewöhnlich wie folgt aus:

H ₂ O _{dd}	x µl
10x NEB-Puffer	5 µl
Enzym 1	1 µl
Enzym 2	1 µl
DNA	y µl (1 µg)
	<hr/> 50 µl

Der Restriktionsansatz wurde in der Regel, wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen, für 1 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Inkubation für 20 min bei 65°C inaktiviert.

2.2.4.5 Dephosphorylierung linearisierter DNA

Die Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA verhindert das Religieren des Vektors ohne Insert. Ein typischer Ansatz zur Dephosphorylierung von Vektor DNA ist im Folgenden aufgeführt:

H ₂ O _{dd}	x µl
DNA	y µl (1 µg)
Antarctic Phosphatase Puffer (10x)	2 µl
Antarctic Phosphatase	1 µl
	<hr/> 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37°C durchgeführt und die Phosphatase anschließend bei 80°C für 2 min inaktiviert. Alternativ wurden die Antarctic Phosphatase und ihr Puffer direkt zu einem Restriktionsansatz gegeben. In diesem Fall erfolgte die Inaktivierung der Phosphatase und der Restriktionsenzyme zur selben Zeit.

2.2.4.6 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose- Gelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA- Fragmenten aus Restriktionsverdauen und von PCR-Produkten. Es wurden 0,9%-ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1xTAE-Puffer aufgekocht und anschließend in eine Trägerplatte gegossen. Zur Ausbildung von Taschen für das Auftragen von DNA wurde vor dem Gießen der Agarose ein Plastikkamm auf der Trägerplatte angebracht. Nach der Polymerisation der Agarose wurde diese in eine horizontale Flachgelapparatur (Firma Biorad), die mit 1xTAE gefüllt wurde, überführt. Die DNA-Proben wurden mit 1 µl DNA-Farbstoff versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V für ca. 60 min. Die negativ geladenen DNA-Fragmente bewegten sich hierbei in Richtung der Anode und wurden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Zur Bestimmung der Größe der Fragmente wurde der DNA-Größenstandard „GeneRuler 1kb DNA-Ladder“ der Firma Fermentas (siehe

Kapitel 2.1.9.1) verwendet. Die Visualisierung der DNA- Fragmente erfolgte mit dem Fas Digi Geldokumentationssystem (Nippon Genetics).

Agarosegel: Agarose 4,5 g
 1xTAE 500 ml

50xTAE: Tris 242,0 g
 Eisessig 57,1 ml
 0,5 M EDTA 100 ml
 ad 1 l H₂O_d

DNA- Farbstoff: MidoriGreen Direct 1 ml
 Bromphenolblaulösung 1 ml

2.2.4.7 Isolierung von DNA aus dem Agarosegel

2.2.4.7.1 Isolierung von DNA mit dem Promega Kit

Die Isolierung von DNA-Fragmenten <10 kb erfolgte mit Hilfe des Promega Wizard® SV Gel and PCR clean-up System Kits nach Hersteller Angaben.

2.2.4.7.2 Phenol-Kälte-Extraktion

Die Isolierung großer DNA-Fragmente (>10 kb) erfolgte mittels Phenol-Kälte-Extraktion. Hierfür wurden die ausgeschnittenen Gelstücke in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und mit einem Glasstab zerrieben. Anschließend wurden 300-400 µl Phenol hinzupipettiert und gut gevortext. Das Phenol-Gel-Gemisch wurde für 20 min. bei -80°C eingefroren. Danach wurde das Gemisch aufgetaut, erneut gut gevortext und für 5 min. bei 13000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat und dem gleichen Volumen Isoamylalkohol-Chloroform (1:24) gemischt und gut geschüttelt. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 min. und 13000 g. Danach wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine DNA-Fällung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.4.8).

2.2.4.8 DNA-Fällung

Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 3 Volumen eiskaltem 100%-igem Ethanol versetzt, gut gemischt und für mindestens 1 h zu -20°C gestellt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min. bei 13000 g. Der Überstand wurde komplett abgenommen, das DNA-Pellet getrocknet und je nach Größe in 10-20 µl H₂O_{DEPC} resuspendiert.

2.2.4.9 Ligation von DNA mit der T4-Ligase

Für die Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten wurde eine T4-Ligase (NEB) verwendet. Bei der Ligationsreaktion wurden Vektor und Insert, die durch den vorangegangenen Verdau mit den gleichen Restriktionsenzymen zueinander passende, einsträngige Überhänge (sticky-ends) besaßen, mit einander verbunden. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde der Ligationsansatz gefällt, in 10 µl H₂O_d aufgenommen und zur Transformation von Bakterien eingesetzt.

Ligationsansatz:

T4-Ligase	2 µl
T4-Ligasepuffer	2 µl
Vektor	1 µg
Insert	3 µg
<hr/>	
ad 20 µl H ₂ O _{dd}	

2.2.4.10 Ligation von DNA mit dem pGEM®-T Easy-Kit

Der pGEM®-T Easy Vektor liegt im Kit in linearisierter Form mit 5'-T-Überhängen vor. Nach der Amplifikation von DNA mit einer Taq-Polymerase besitzen die PCR-Produkte 3'-A-Überhänge. Dies ermöglicht die direkte Ligation von PCR-Produkten, nachdem sie wie unter 2.2.4.7.1 beschrieben aufgereinigt wurden. Ein Ligationsansatz mit dem T Easy-Kit sah wie folgt aus:

pGEM®-T Easy Ligationsansatz:

T Easy Ligase	2 µl
T Easy Puffer (2x)	10 µl
T Easy Vektor	100 ng
Insert	300 ng
<hr/>	
	ad 20 µl H ₂ O _{dd}

Die Ligation erfolgte bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde der Ligationsansatz gefällt, in 10 µl H₂O_d aufgenommen und zur Transformation von Bakterien eingesetzt.

2.2.4.11 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“) dient der Amplifikation von DNA. Als Template werden chromosomale DNA oder Plasmid-DNA eingesetzt. Bei der Reaktion wird von einer temperaturstabilen DNA-Polymerase der komplementäre Strang des gewünschten DNA-Fragmentes synthetisiert. Ausgangspunkt sind sequenzspezifische Primer. Bei jedem Amplifikationszyklus (n) entsteht eine Kopie des gewünschten DNA-Fragmentes, so dass nach n Zyklen 2ⁿ Kopien des Fragmentes vorliegen. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl angesetzt. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze mit den verschiedenen verwendeten Polymerasen sind nachfolgend aufgeführt. Für gewöhnlich wurde die TopTaq-Polymerase für PCRs eingesetzt, in Fällen, wo jedoch ein PCR-Produkt ohne 5'-T-Überhang benötigt wurde, wurde die KAPA HiFi HotStart-Polymerase genutzt.

PCR mit TopTaq-Polymerase (Qiagen):

H ₂ O _{dd}	31,5 µl
10x TopTaqPuffer	2 µl
Q-Solution	10 µl
Primer 1 (100 pmol/µl)	0,5 µl
Primer 2 (100 pmol/µl)	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
TopTaq DNA-Polymerase	0,5 µl
Template	1 µl
<hr/>	
	50 µl

PCR mit KAPA HiFi HotStart-Polymerase:

H ₂ O _{dd}	16,25 µl
5x KAPA HiFi Puffer	5 µl
10 mM KAPA dNTP Mix	0,75 µl
Primer 1 (100 pmol/µl)	0,75 µl
Primer 2 (100 pmol/µl)	0,75 µl
KAPA HiFi HotStart DNA-Polymerase	0,5 µl
Template	1 µl
	<hr/> 25 µl

Ein PCR-Zyklus lässt sich in drei Schritte unterteilen. Zuerst wird die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge denaturiert. Es folgt das Anlagern (Annealing) der Primer und schließlich die Elongation. Hierbei werden die Primer in 5'-3'- Richtung durch die DNA-Polymerase unter Verwendung von Desoxiribonukleotiden (dNTPs) verlängert. Diese drei Reaktionsschritte werden in 30-40 Zyklen wiederholt.

Reaktionsschritte der PCR:

	TopTaq		KAPA HiFi HotStart	
1. Initiale Denaturierung	94°C	3 min	95°C	3 min
2. Denaturierung	94°C	1 min	98°C	20 sec
3. Annealing	55-60°C	45 sec-1 min	55-60°C	15 sec
4. Elongation	72°C	1min/kb	72°C	15-60 sec/kb
5. Finale Elongation	72°C	10 min	72°C	1 min/kb
6. Pause	16°C		16°C	

Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Länge der Primer und deren GC-Gehalt. Sie kann annäherungsweise mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$T_m = [(G+C) \times 4] + [(A+T) \times 2]$$

T_m = Schmelztemperatur (°C); G = Guanin; C = Cytosin; A = Adenin; T = Thymin

Die Elongationszeit wurde abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes gewählt. Dabei wurde als Richtwert 1000 bp/min angenommen. Die PCR-Produkte wurden

anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.4.6) aufgetrennt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4.12 Aufkoch-PCR

Die Aufkoch-PCR wurde für die Überprüfung einzelner Kolonien auf erfolgreiche Transformation genutzt. Dazu wurde etwas Koloniematerial mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in 50 µl H₂O eingepflegt und diese Suspension für 10 min bei 100°C gekocht. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 5000 g. Für die PCR wurden 5 µl des Überstandes als Template eingesetzt, das gesamte Reaktionsvolumen betrug 50 µl.

Aufkoch-PCR mit TopTaq-Polymerase (Qiagen):

H ₂ O _{dd}	27,5 µl
10x TopTaqPuffer	5 µl
Q-Solution	10 µl
Primer 1 (100 pmol/µl)	0,5 µl
Primer 2 (100 pmol/µl)	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
TopTaq DNA-Polymerase	0,5 µl
Template	1 µl
	<hr/> 50 µl

2.2.4.13 Semiquantitative PCR

Für die semiquantitative PCR wurde der gleiche Reaktionsansatz wie für eine „normale“ PCR (siehe Kapitel 2.2.4.10) verwendet. Im Unterschied zu der konventionellen PCR wird hier in allen Proben eine definierte Menge DNA eingesetzt und diese bei verschiedenen Zyklenzahlen laufen gelassen. Auf diese Weise kann die Menge eines bestimmten PCR-Produktes zwischen verschiedenen DNA-Proben semiquantitativ verglichen werden. Für die semiquantitative PCT wurden hier für jeden Ansatz 21 ng DNA und 19, 22 und 25 Zyklen angewendet.

2.2.4.14 Real-time PCR

Für die Real-time PCR wurde das “ABI 7500 Real Time PCR System” und der „TaqMan® Environmental Master Mix 2.0“ (Applied Biosystems) verwendet. Als Template diente chromosomale DNA. Für die Detektio der Amplifikation der doppelsträngigen DNA wurden sequenzspezifische Hydrolyse-Sonden eingesetzt, die an ihrem 5′-Ende mit einem Fluorophor und an ihrem 3′-Ende mit einem Quencher markiert sind. Die Seuqnz der Hydrolyse-Sonden wurde dabei so gewählt, dass sie zwischen den beiden Primerseuqnzen lokalisiert war. In jedem PCR-Zyklus binden sowohl die Primer als auch die Hydrolyse-Sonde sequenzspezifisch an das DNA-Template. Die zur Amplifikation genutzte Polymerase besitzt neben ihrer Polymeraseaktivität auch eine 5′-3′-Exonukleaseaktivität. Trifft die Polymerase nun auf die gebundene Hydrolyse-Sonde, wird diese abgebaut. Dabei kommt es zur räumlichen Trennung des Fluorophors und des Quenchers, wodurch eine Fluoreszenzsignal detektierbar wird, das am Ende eines jeden Amplifikationszyklusses gemessen wird. Der Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert überschreitet, wird als Ct-Wert (*cycle threshold*) bezeichnet. Ein Reaktionsansatz für die Real-time PCR sah wie folgt aus:

Environmental Mast Mix	6,25 µl
Primer F (100 nM)	0,75 µl
Primer R (100 nM)	0,75 µl
Hydrolyse-Sonde (100 nM)	0,5 µl
H ₂ O _{dd}	12 µl
Template	5 µl
	25 µl

Für die Amplifikation wurden folgende Reaktionsschritte durchlaufen:

1. Initiale Inkubation	95°C	10 min
2. Denaturierung	95°C	15 sec
3. Annealing und Elongation	60°C	1 min

Die Schritte 2 und 3 wurden 40 mal durchlaufen.

Für die Berechnung der Kopienzahl der FIV-Vektoren wurde chromosomale DNA der Stämme *Fth* LVS FIV1-Val und *Fth* LVS FIV2-Val in jeweils drei Verdünnungen (0,1; 0,01

und 0,001 ng) verwendet. Es wurden jeweils Doppelwerte pipettiert. Als Zielgen für die Vektoren wurde das CmR-Gen gewählt. Als Referenzgen diente das chromosomal kodierte Gen *fopA*, von dem bekannt ist, dass es in einfacher Kopie vorliegt. Die Berechnung der Kopienzahl erfolgte mittels der ΔC_t -Methode. Hierbei wird die Kopienzahl des Zielgens relativ zum Referenzgen nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Kopienzahl} = 2^{-(C_{t\text{Zielgen}} - C_{t\text{Referenzgen}})}$$

Für die Kopienzahl der Vektorvarianten wurde aus den Werten der drei Verdünnungsstufen ein Mittelwert gebildet.

2.2.4.15 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von DNA wurde das „ABI-BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ genutzt. Ein für die Sequenzierung bestimmter Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

H ₂ O _{dd}	6 µl
BigDye	1 µl
5xPuffer ABI	1,5 µl
Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
DNA	1 µl
	<hr/> 10 µl

Das für die Sequenzierung verwendete Programm bestand aus folgenden Schritten:

1. Initiale Denaturierung	96°C	2 min
2. Denaturierung	96°C	10 sec
3. Annealing	54°C	10 sec
4. Elongation	60°C	4 min
5. Pause	4°C	

Die Schritte 2-4 wurden in 25 Zyklen durchlaufen.

Die weitere Aufreinigung und Sequenzierung erfolgte durch das Sequenzierlabor des Robert-Koch Institutes. Für die Auswertung der Sequenzen wurde die Software *Geneious Version 10* verwendet.

2.2.5 Transformation von Bakterien

2.2.5.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Für die chemische Transformation wurden OneShot® Top10 Chemically Competent *E. coli* der Firma Invitrogen verwendet. Ein 50 µl-Aliquot der Zellen wurden auf Eis aufgetaut und Plasmid-DNA hinzugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgten ein Hitzeschock bei 42°C für 30 sek und eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Anschließend wurden 250 µl SOC-Medium zu den Zellen gegeben und diese für 1 h bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Für die Selektion positiver Klone wurden die Bakterien auf Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.5.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Um elektrokompetente Bakterien herzustellen, wurden *E. coli* DH5α zunächst über Nacht in 50 ml LB-Medium bei 37°C und 225 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurden 200 ml frisches LB-Medium mit 15 ml der Übernachtskultur inokuliert und die Bakterien für 3-4 h bei 37°C und 225 rpm inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,8-1 erreicht hatten. Anschließend wurde die Kultur auf 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei 4°C und 4500 g für 10 min. zentrifugiert. Die anschließenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 40 ml 10%-igem Glycerin gewaschen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 4500 g für 15 min. Der Waschschrift wurde wiederholt und anschließend wurden die Bakterienpellets in 40 ml 10%-igem Glycerin vereint und ein letztes Mal bei 4°C und 4500 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 2 ml verworfen, das Pellet darin resuspendiert und à 80 µl auf vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Die Lagerung der Bakterienaliquots erfolgte bei -80°C.

2.2.5.3 Herstellung elektrokompetenter Francisellen

Für die Herstellung elektrokomponenter Francisellen wurden diese über Nacht in 25 ml MediumT bei 37°C und 225 rpm kultiviert. Je 10 ml Kultur wurden in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 4000 g pelletiert. Das Pellet wurde in 40 ml 0,5 M Sucrose gewaschen und für 15 min bei 4500 g zentrifugiert. Nach einem zweiten Waschschrift wurde der Überstand bis auf ca. 500 µl verworfen. Das Bakterienpellet wurde in den verbleibenden 500 µl resuspendiert und diese Zellsuspension sofort für die Elektroporation eingesetzt.

2.2.5.4 Transformation elektrokompenter Bakterien

Die Elektroporation wurde zur Transformation von elektrokompenten Bakterien mit Plasmid-DNA eingesetzt. Sie wurde mit Hilfe einer Gene Pulse XCell der Firma Biorad durchgeführt.

Ein 80 µl-Aliquot elektrokompenter *E. coli* (siehe Kapitel 2.2.5.1) wurde auf Eis aufgetaut und Plasmid-DNA hinzugegeben. Die Suspension wurde in eine eisgekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvette überführt und die Zellen bei 1,7 kV, 25 µF und 100 Ω transformiert. Anschließend wurden die Bakterien sofort in 1 ml warmes LB-Medium überführt und für 50 min bei 37°C und 300 rpm inkubiert.

Für die Transformation von Francisellen wurde Plasmid-DNA zu frisch hergestellten 500 µl-Aliquots der Bakterien (siehe Kapitel 2.2.5.3) hinzugegeben. Die Bakteriensuspension wurde in eine 0,2 cm Elektroporationsküvette überführt und die Francisellen bei 2,5 kV, 25 µF und 600 Ω transformiert. Anschließend wurden die Bakterien sofort in 1 ml warmes MediumT überführt und für 4 h bei 37°C und 350 rpm inkubiert.

Die Bakterien wurden anschließend auf entsprechenden Agarplatten, denen zur Selektion positiver Klone Antibiotika und ggf. Sucrose zugesetzt wurden, ausplattiert und bei 37°C bzw. 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der erfolg der Transformation wurde mittels spezifische Primer in einer „Aufkoch-PCR“ (siehe Kapitel 2.2.4.12) überprüft.

2.2.6 Proteintechniken

2.2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Masse. Das im Puffer enthaltene β-Mercaptoethanol löst die Tertiärstruktur der Proteine durch die Reduktion der Disulfidbrücken auf. SDS („sodium dodecyl sulfate“= Natriumdodecylsulfat), ein Anion, lagert sich an die Proteine an, denaturiert sie und überlagert ihre Eigenladung. Dabei ist die Ladungsmenge ungefähr proportional zur Masse der Proteine. Die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe wandern in einem elektrischen Feld abhängig von ihrer Masse unterschiedlich schnell durch das Gel zur positiv geladenen Anode.

Die Herstellung von SDS-Minigelen (siehe Tabelle 11) erfolgte unter Verwendung einer Mini-Protean Tetra Cell Gelapparatur. Zunächst wurden die Glasplatten mit Ethanol gereinigt und

in den Gießstand eingespannt. Es wurde das 12%-ige Trenngel gegossen und dieses mit Ethanol überschichtet, um die Ausbildung einer sauberen Trennschicht zu gewährleisten. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Ethanol restlos entfernt und das 5%-ige Sammelgel gegossen. Um das spätere Auftragen von Proben zu ermöglichen, wurde ein Kamm in das Sammelgel eingesetzt, wodurch Taschen ausgebildet wurden. Nach der Polymerisation des Gels wurde es in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit 1xSDS-Laufpuffer gefüllt. Es wurde darauf geachtet, dass sich unter dem Gel keine Luftblasen befanden, die später den Stromfluss und damit den Lauf der Proben im Gel stören könnten.

Tabelle 11 Mengen, die für das Gießen von zwei SDS-Minigelen benötigt werden.

Substanz	Trenngel (12%)	Sammelgel (5%)
30% Acrylamidlösung (Rotiphorese® Gel 30)	4,8 ml	1,33 ml
H ₂ O _d	4,2 ml	4,4 ml
Tris-Puffer	3 ml (1 M, pH 8,8)	2 ml (0,5 M, pH 6,6)
10% SDS (w/v)	120 µl	80 µl
10% APS (w/v) in H ₂ O _d	60 µl	40 µl
TEMED*	7,5 µl	5 µl

Gleiche Mengen der aufzutragenden Proben (siehe Kapitel 2.2.7) wurden mit Probenpuffer (Roti®-Load 1, 4-fach Konzentrat, BioRad) versetzt und für 5 min bei 100°C gekocht. Anschließend wurden die Proben sowie 3 µl des Größenstandards (siehe Kapitel 2.1.9.2) auf das SDS-Gel aufgetragen. Es wurde zunächst eine Spannung von 80 V angelegt, bis die Proben in das Trenngel gelaufen waren. Danach wurde die Spannung auf 130 V erhöht und das Gel so lange laufen gelassen, bis die Lauffront aus dem Gel lief.

10xSDS-Laufpuffer:

30 g	Tris/HCl
144,4 g	Glycin
10 g	SDS
ad 1 l H ₂ O _d .	

2.2.6.2 Western Blot (Semi-Dry-Verfahren)

Der Western Blot dient der Übertragung von in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen auf Membranen aus z.B. Nitrocellulose (NC). Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die durch das SDS negativ geladenen Proteine zur Anode.

Eine NC-Membran sowie 6 Filterpapiere wurden in Towbinpuffer getränkt und auf die Anodenplatte aufgelegt. Auf drei Filterpapiere folgte die NC-Membran, das SDS-Gel und schließlich drei weitere Filterpapiere. Die Kathodenplatten wurde aufgelegt und für 75 min ein Strom von 0,8 mA/cm² Membran angelegt.

Towbinpuffer:	3 g	Tris
	14,4 g	Glycin
	20%	Methanol
	ad 1 l H ₂ O _d	

2.2.6.3 Detektion von Proteinen mit Antikörpern

Für die Detektion von Proteinen auf einer NC-Membran werden proteinspezifische Antikörper eingesetzt. Nachdem diese primären Antikörper an das gewünschte Protein gebunden haben, werden sekundäre Antikörper eingesetzt, die gegen den erst Antikörper gerichtet sind. An diese sekundären Antikörper ist ein Enzym, wie z.B. eine Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt, welches eine Reaktion katalysiert, durch die die Position des Proteins auf der Membran sichtbar wird.

Nach dem Blotten wurde die NC-Membran entweder über Nacht ohne Schütteln oder für 1 h Stunde unter Schütteln bei 20 rpm in 5% (w/v) Milch-TBS geblockt. Anschließend wurde die Membran einmal für 10 min mit 1x-TBS gewaschen und danach für 1 h bei 30 rpm mit dem primären Antikörper (Kanninchen- α -GFP, ThermoFisher A11122, 1:1000 in 5% (w/v) Milch-TBS) inkubiert. Es folgten drei weitere 10 min Waschschrte in 1x-TBS und die Inkubation für 1 h bei 20 rpm mit dem sekundären Antikörper (Ziege- α -Kanninchen-HRP 1:1000 in 5% (w/v) Milch-TBS). Nach erneuten drei 10 min Waschschrten in 1x-TBS erfolgte die Entwicklung mit ECL-Lösung (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate). Lösung 1 und Lösung 2 wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran aufgetragen. Nach 2 min Inkubation wurde die Lösung entfernt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Das in der Lösung enthaltene Luminol wird in Gegenwart von H₂O₂ und einer Peroxidase oxidiert, wobei Licht

entsteht. Die Intensität des Signals auf dem Röntgenfilm hängt hierbei von der Menge des vorhandenen Proteins, und damit der Menge an HRP-gekoppeltem sekundären Antikörper, sowie der Inkubationszeit ab.

10x TBS: 76,5 g NaCl
 54 g HCl

In H₂O_d lösen, den pH-Wert auf pH 7,6 einstellen, ad 1000 ml und die Lösung autoklavieren.

2.2.7 Stabilitätstestung

Um zu überprüfen, ob die FIV-Val-Vektoren stabil im Genom der verschiedenen *Francisella* Spezies integriert bleiben, wurden zunächst Übernachtskulturen der zu untersuchenden Stämme in 3 ml MediumT+Cm (8 µg/ml) bei 37°C und 225 rpm angezogen. Am nächsten Tag wurden 3 ml frisches MediumT ohne Antibiotikum mit 200 µl der Übernachtskultur inokuliert und die Kultur weiter bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Das Überimpfen der Kultur wurde insgesamt 10-mal wiederholt. Danach wurden die Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt, verdünnt, mit Hilfe des Spiral Platers parallel auf HCA und HCA+ Cm ausplattiert und 1 bis 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die CFU bestimmt.

Von der auf OD₆₀₀ = 1 eingestellten Kultur wurde 300 µl Aliquots abgenommen und für die Isolation chromosomaler DNA (siehe Kapitel 2.2.4.2) mit anschließender PCR- Analyse (siehe Kapitel 2.2.4.10) und für die SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.2.6.1) verwendet.

2.2.8 Infektionsversuche

Die intrazelluläre Vermehrung des *Fth* LVS Wildtyps sowie einer *Fth AiglC* Deletionsmutante, deren Komplementante und des Stammes *Fth* LVS FIV1-Val wurde in der Zelllinie U937 untersucht. Hierfür wurden zunächst die Zellen einer vollbewachsenen 175 cm² Flasche auf 4 neue 175 cm² Flaschen aufgeteilt und durch die Zugabe von Phorbol 12- Myristat 13-Acetat (Endkonzentration 50 ng/ml) das Ausdifferenzieren zu Makrophagen-ähnlichen Zellen induziert. Es folgte eine Inkubation für 1,5 Tage bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend wurde der Überstand aus den Flaschen abgegossen, einmal mit 15 ml 1xPBS gewaschen und schließlich die Zellen durch Zugabe von 10 ml 0,2% EDTA in 1xPBS abgelöst. Nach kurzer Inkubation wurde die EDTA-PBS-Lösung abgegossen und die Zellen durch Klopfen vom Flaschenboden gelöst. Anschließend wurden die Zellen in RPMI+ 10%

FKS aufgenommen, in ein 50 ml Röhrchen überführt und die Zellzahl mittels einer Zählkammer nach Neubauer (siehe Kapitel 2.2.3.1) bestimmt. Die Zellen wurden bei 800 g für 10 min pelletiert und anschließend in RPMI+ 10% FKS auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in eine Vertiefung einer 24-Napfplatte eingesät und die Zellen für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Francisellen, die über Nacht in MediumT bei 37°C und 225 rpm inkubiert wurden, wurden auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und bis zu einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in RPMI verdünnt. Für den 0 h-Wert wurden die Bakterien bis zu einer Konzentration von 10^4 Zellen/ml verdünnt und mit dem Spiral Plater auf HCA-Agar ausplattiert. Zum Start der Infektion wurde der Überstand der U937 Zellen abgenommen und je 1 ml Bakteriensuspension der Konzentration 10^6 Zellen/ml in jede Vertiefung pipettiert, was einer MOI (multiplicity of infection) von 10 entspricht. Die Zellen wurden für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ mit den Bakterien inkubiert. Anschließend wurde der Bakterienüberstand abgenommen und 2x mit RPMI gewaschen. Um alle extrazellulären Bakterien abzutöten, folgte eine einstündige Inkubation mit RPMI+ Gentamycin (50 µg/ml). Es folgten 3 weitere Waschschrte mit RPMI bevor in jede Vertiefung 1 ml RPMI gegeben wurde. Um den 3 h-Wert zu erhalten wurden die U937 Zellen durch Zugabe von 10 µl 10% Saponin lysiert und die Zellsuspension mit dem Spiralplater auf HCA-Agar ausplattiert. Die Infektion wurde weiter bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und alle 24 h ein Wert wie für den 3 h-Wert beschrieben genommen. Bei Bedarf wurden die Proben vor dem Ausplattieren verdünnt. Es wurden je zwei Vertiefungen je Stamm und Zeitpunkt verwendet und die Zellsuspensionen wurden jeweils auf 2 HCA-Platten ausplattiert. Um die Stabilität von FIV1-Val während einer Infektion zu überprüfen, wurden die Zellsuspensionen des Stammes *Fth* LVS FIV1-Val und der *iglC*-Komplementante parallel auf HCA ohne Antibiotikum und auf HCA+Cm ausplattiert.

10x PBS:	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1,15 g	Na ₂ HPO ₄
	0,2 g	KH ₂ PO ₄

In 1 l H₂O_d lösen und autoklavieren.

2.2.9 Bestimmung der Transformationseffizienz

Um die Transformationseffizienz verschiedener verkürzter Varianten von FhaGI-1 in *Fth* LVS zu bestimmen, wurden Übernachtskulturen des Stammes wie unter 2.2.5.3 elektrokompotent gemacht. Um das gleiche Ausgangsmaterial für alle Transformationen zu erhalten, wurden mehrere Übernachtskulturen zusammengefasst und erst danach zu 10 ml auf 50 ml Reaktionsgefäße verteilt. Es wurde je 1 µg Plasmid-DNA der verschiedenen Konstrukte für die Transformation eingesetzt. Nach der Inkubation bei 37°C wurden die Kulturen 1:10 verdünnt und sowohl verschiedene Mengen der unverdünnten sowie der verdünnten Zellsuspension auf HCA+ Km ausplattiert. Nach drei Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die CFU für die verschiedenen Konstrukte bestimmt.

2.2.10 *In Silico* Analyse

Für die Suche nach Repeat-Sequenzen und den Abgleich von Proteinsequenzen wurde das Programm BLAST („*basic local alignment search tool*“) der Seite NCBI verwendet (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Die Visualisierung von Genomen und die genauere Überprüfung der für FphGI-1 kodierenden Region erfolgte mit Hilfe des Programms *Artemis* Version 12 (<https://www.sanger.ac.uk/science/tools/artemis>) (Rutherford et al., 2000). Eine Liste der verwendeten Genome ist in Tabelle 3 aufgeführt. Für die Auswertung von DNA-Sequenzen wurde das Programm *Geneious* Version 10 (Auckland, Neuseeland) verwendet. Die Erstellung der Vektorkarten erfolgte mit dem Programm *Lasergene SeqBuilder Pro* (DNASTAR, Madison, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Die Genominsel FhaGI-1

3.1.1 Funktionelle Charakterisierung von FhaGI-1

Bei Untersuchungen zu CRISPR/Cas-Systemen in *Francisella* wurde im Stamm *Fhis* AS02-814 eine GI, genannt FhaGI-1 gefunden, die in das tRNA^{Val}-Gen integriert vorliegt (Schunder et al., 2013). Bei Analysen mit genomischer DNA des Stammes konnten sowohl die integrierte Form als auch die exzidierte, zirkuläre Form der GI nachgewiesen werden (Niehaus, 2014).

Da der Stamm *Fhis* AS02-814 für Untersuchungen nicht zur Verfügung stand, wurden für die weitergehenden Untersuchungen verkürzte Varianten von FhaGI-1 konstruiert, die anschließend synthetisch hergestellt wurden. Eine schematische Darstellung des Aufbaus dieser Konstrukte im Vergleich zu FhaGI-1 ist in Abbildung 8 A dargestellt. Um die Mechanismen der Exzision sowie die Rolle der ortsspezifischen Tyrosin-Rekombinase zu untersuchen, wurde das synthetische Konstrukt FhaGI-1_Reg, bestehend aus der tRNA^{Val}, einer Kanamycinresistenzkassette (KmR) mit dem Promotor GroEL und den GI-Genen FN3523_1026-1033 sowie der *attR*-Stelle, hergestellt (Abbildung 8 A, a). Die Gene FN3523_1026 bis FN3523_1033 sind potentiell an der Exzision und Integration der GI beteiligt und wurden deshalb in das Konstrukt integriert. Hierbei kodiert das Gen FN3523_1033 für eine ortsspezifische Tyrosin-Rekombinase (Phagenintegrase), das Gen FN3523_1028 für ein putatives Phagenrepressorprotein, das Gen FN3523_1027 für ein Protein, das möglicher Weise am Wechsel von der lytischen zur lysogenen Form beteiligt ist, und das Gen FN3223_1026 für ein putatives Phagen-Replikationsprotein (Abbildung 8 B). Zur genaueren Untersuchung der Rolle der ortsspezifischen Integrase wurden zwei weitere Konstrukte hergestellt. Das erste, FhaGI-1_Reg-ΔInt, entspricht in seinem Aufbau FhaGI-1_Reg, bis auf eine 1020 bp lange Deletion im Gen der Integrase (FN3523_1033) (Abbildung 8 A, b). Das Konstrukt FhaGI-1_Int besteht nur aus der tRNA^{Val}, der KmR, dem Integrasegen sowie der *attR*-Stelle (Abbildung 8 A, c). Zusätzlich wurde als „Nullkontrolle“ das Konstrukt FhaGI-1_attRL konstruiert, dass nur aus der tRNA^{Val}, der KmR und der *attR*-Stelle besteht (Abbildung 8 A, d). Die vier verkürzten Konstrukte wurden synthetisiert, in den Vektor pUC57 kloniert und überprüft.

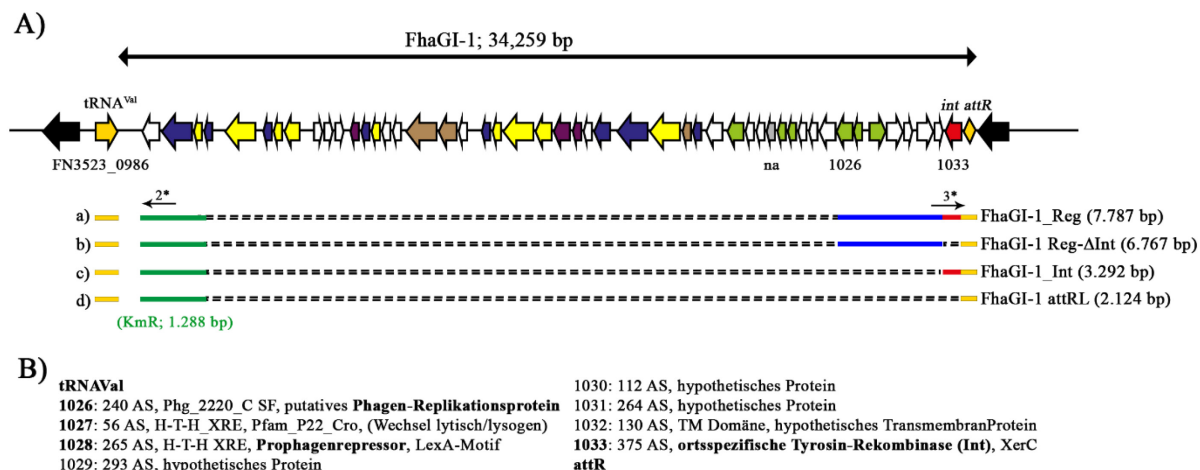


Abbildung 8: Schematische Darstellung verkürzter Varianten von FhaGI-1. A) Aufbau der Konstrukte FhaGI-1_Reg (a), FhaGI-1_Reg-ΔInt (b), FhaGI-1_Int (c) und FhaGI-1_attRL im Vergleich zu FhGI-1. Ein orangener Pfeil steht für die tRNA^{Val}; Pfeile in gelb, dunkelblau, hellgrün und braun stellen Gene, die für den putativen Prophagen von *Fhis* AS02-814 kodieren; weiße Pfeile zeigen hypothetische Proteine; und ein roter Pfeil steht für die ortsspezifische Integrase (*int*); die *attR*-Stelle wird durch eine orangene Raute dargestellt. In den Konstrukten stehen orange Linien für die tRNA^{Val} sowie *attR*-Stelle; die grüne Linie für die KmR; die gestrichelte Linie für den Bereich von FhaGI-1, der nicht im Konstrukt enthalten ist; die blaue Linie für regulatorische Gene und die rote Linie für die ortsspezifische Integrase. Pfeile mit Ziffern zeigen die Position der Primer, die zur Überprüfung der Bildung der episomalen Form verwendet wurden. B) Liste der in FhaGI-1_Reg enthaltenen Gene mit Funktionen oder bekannten Motiven; AS, Aminosäuren (Verändert und erweitert nach Rydzewski et al., 2015).

3.1.1.1 Funktionalität in *E. coli*

In einem ersten Schritt wurden die Konstrukte in *E. coli* transformiert. Abbildung 9 A zeigt die möglichen Formen, die in den Transformanden vorliegen können, sofern die Konstrukte funktional sind. Neben dem kompletten Konstrukt, integriert in den pUC57-Vektor (pFhaGI-1_Reg), können sowohl die episomale Form mit der *attP*-Stelle als auch der „leere“ pUC57-Vektor mit der *attB*-Stelle vorliegen. Die Pfeile mit Ziffern zeigen die Bindungsstellen der Primer, die für den Nachweis der verschiedenen Formen genutzt wurden.

Wie in Abbildung 9 B zu sehen ist, verhalten sich die Konstrukte FhaGI-1_Reg und FhaGI-1_Int im rekombinanten System gleich. Für beide konnte sowohl die episomale Form mit der *attP*-Stelle als auch der „leere“ Vektor mit der verbleibenden tRNA^{Val} (*attB*-Stelle) nachgewiesen werden (Primer Fha-2*/Fha-3* und Fha-1^P/Fha-4^P, Spuren a und c). Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Konstrukte trotz ihres unterschiedlichen Aufbaus bereits im rekombinanten System funktional sind.

Für das Konstrukt FhaGI-1_attRL konnten mit den Primerpaaren Fha-2*/Fha-3* und Fha-1^P/Fha-4^P nur ein schwaches bzw. kein Produkt und damit nur geringe Mengen der episomalen Form und die intakte tRNA^{Val} gar nicht nachgewiesen werden (Abbildung 9 B, Spuren d). Dies deutet daraufhin, dass bei diesem Konstrukt die Funktionalität im rekombinanten System eingeschränkt ist und es nicht wie die anderen Konstrukte exzidiert wird.

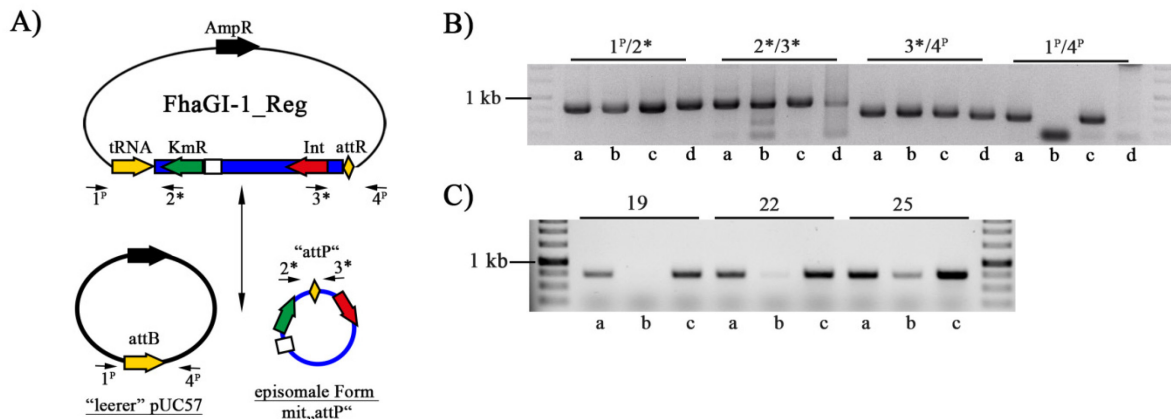


Abbildung 9: Analyse der Exzision von FhaGI-1 mit Hilfe verkürzter synthetischer Konstrukte. A) Mögliche Formen von FhaGI-1_Reg nach Transformation in *E. coli*. Das komplette Konstrukt, integriert in den Vektor pUC57, die episomale Form mit der attP-Stelle, sowie der „leere“ pUC57-Vektor mit der attB-Stelle. Ein orangener Pfeil steht für die tRNA^{Val}, ein grüner Pfeil für die KmR; ein weißes Rechteck steht für den Promotor GroES, die ortsspezifische Integrase wird durch einen roten Pfeil dargestellt und die attR-Stelle durch eine orangefarbene Raute. Eine blaue Linie steht für den Bereich der Konstrukte, der die episomale Form bildet. Pfeile mit Ziffern stehen für Lokalisation und Orientierung spezifischer Primer. B) PCR-Analyse von *E. coli*-Transformanten mit FhaGI-1_Reg (a), FhaGI-1_Reg-ΔInt (b), FhaGI-1_Int (c) und FhaGI-1_attRL (d). Die Primer 2*/3* (Fha-2*/Fha-3*; Produkt: ca. 730 bp) zeigen die episomale Form, und die Primer 1^P/4^P (Fha-1^P/Fha-4^P; Produkt: ca. 430 bp) zeigen den „leeren“ Vektor mit der attB-Stelle. Die Primerkombinationen 1^P/2* (Fha-1^P/Fha-2*; Produkt: ca. 670 bp) und 3*/4^P (Fha-3*/Fha-4^P; Produkt: ca. 450 bp) demonstrieren die integrierte Form der Konstrukte. C) Semiquantitative PCR von *E. coli*-Transformanten mit FhaGI-1_Reg (a), FhaGI-1_Reg-ΔInt (b) und FhaGI-1_Int (c) zum Nachweis der episomalen Form in den verkürzten Konstrukten von FhaGI-1. Es wurden 19, 22 und 25 Zyklen, 21 ng DNA und die Primer Fha-2*/Fha-3* genutzt. (Verändert und erweitert nach Rydzewski et al., 2015).

Auch das Konstrukt FhaGI-1_Reg-ΔInt unterscheidet sich in seinem Verhalten deutlich von den anderen Konstrukten. Hier ist zwar mit den Primern Fha-1^P/Fha-4^P kein Produkt nachweisbar (Abbildung 9 B, Spur b), jedoch konnte mit den Primern Fha-2*/Fha-3* eine Bande für die episomale Form nachgewiesen werden (Abbildung 9 B, Spur b). Für alle Konstrukte ließ sich allerdings die in den Vektor integrierte Form nachweisen (Primer

Fha-1^P/Fha-2* und Primer Fha-3*/Fha-4^P). Um genauer zu analysieren, ob für FhaGI-1_Reg-ΔInt die episomale Form im Vergleich zu FhaGI-1_Reg und FhaGI-1_Int in reduzierter Menge vorliegt und dies bei den gewählten PCR-Bedingungen nicht sichtbar ist, wurde eine semiquantitative PCR mit 19, 22 und 25 Zyklen durchgeführt. Das Konstrukt FhaGI-1_attRL wurde bei dieser Analyse nicht mitgeführt, da für dieses bereits mit der normalen Zyklenzahl kaum Produkt nachweisbar war. Für die Konstrukte FhaGI-1_Reg und FhaGI-1_Int sind bereits nach 19 Zyklen deutliche Banden zu erkennen, die in ihrer Intensität bei 22 und 25 Zyklen nur noch leicht zunehmen (Abbildung 9 C, Spuren a und c). Für FhaGI-1_Reg-ΔInt zeigt sich hingegen ein anderes Bild. Bei 19 Zyklen ist für dieses Konstrukt kein Produkt in der PCR nachweisbar. Erst bei 22 Zyklen zeigt sich eine schwache Bande, die bei 25 Zyklen noch etwas an Intensität zunimmt (Abbildung 9 C, Spuren b). Dieses Ergebnis zeigt, dass die episomale Form des Konstruktes bei FhaGI-1_Reg-ΔInt gegenüber FhaGI-1_Reg in reduzierter Menge vorliegt und deutet darauf hin, dass die ortspezifische Integrase an der Bildung der episomalen Form beteiligt ist. Die Tatsache, dass in dem Konstrukt FhaGI-1_attRL kaum episomale Form nachweisbar ist, zeigt zudem, dass die Integrase nicht nur an der Bildung der episomalen Form beteiligt, sondern auch dafür notwendig ist. Zudem haben die Untersuchungen gezeigt, dass die verkürzten Varianten von FhaGI-1, bis auf FhaGI-1_attRL, auch in *E. coli* bereits voll funktional sind.

3.1.1.2 Funktionalität in *Francisella*

Als nächstes sollte die Funktionalität der Konstrukte in Francisellen überprüft werden. Für diese Untersuchungen wurde der Stamm *Fth* LVS ausgewählt. Zunächst wurden die verschiedenen Konstrukte in den Stamm transformiert und wie unter 2.2.9 beschrieben die Transformationseffizienz bestimmt. Die Transformationseffizienz sollte hierbei als Indikator für die Menge an episomaler Form dienen, da diese die Form der GI ist, die in das Genom integrieren soll (Abbildung 10 B). Es ist zu sehen, dass auch die „Nullkontrolle“ FhaGI-1_attRL zu Transformanden führt. Jedoch ist sie mit fast 10² CFU/ml ungefähr um den Faktor 1000 gegenüber den anderen Konstrukten in der Transformationseffizienz reduziert (Abbildung 10 A, d). Für die Konstrukte FhaGI-1_Reg und FhaGI-1_Int konnte eine Transformationseffizienz von 10⁴ bis 10⁵ CFU/ml nachgewiesen werden, die sich zwischen diesen beiden Konstrukten nicht signifikant unterscheidet. (Abbildung 10 A, a und c). Bei FhaGI-1_Reg-ΔInt liegt die Transformationseffizienz knapp unter 10⁴ CFU/ml und ist sowohl gegenüber FhaGI-1_Reg als auch gegenüber FhaGI-1_Int signifikant reduziert (Abbildung 10 A, Vergleich b mit c und a).

Nach erfolgreicher Selektion sollten durch PCR nur noch die episomale und die chromosomal integrierte Form der Konstrukte nachweisbar sein. Für die Überprüfung der *Francisella*-Transformanden wurden die Primer Fha-1^P und Fha-4^P durch die stammspezifischen Primer Fha-1 und Fha-4* ersetzt (Abbildung 10 B). Für alle vier Konstrukte konnte die chromosomal integrierte Form nachgewiesen werden (Abbildung 10 C, Fha-1/Fha-2* und Fha-3*/Fha-4*). Auch die episomale Form und die chromosomale *attB*-Stelle konnten für alle Konstrukte, auch FhaGI-1_ΔInt und FhaGI-1_attRL, nachgewiesen werden (Abbildung 10 C, Fha-2*/Fha-3* und Fha-1/Fha-4*).

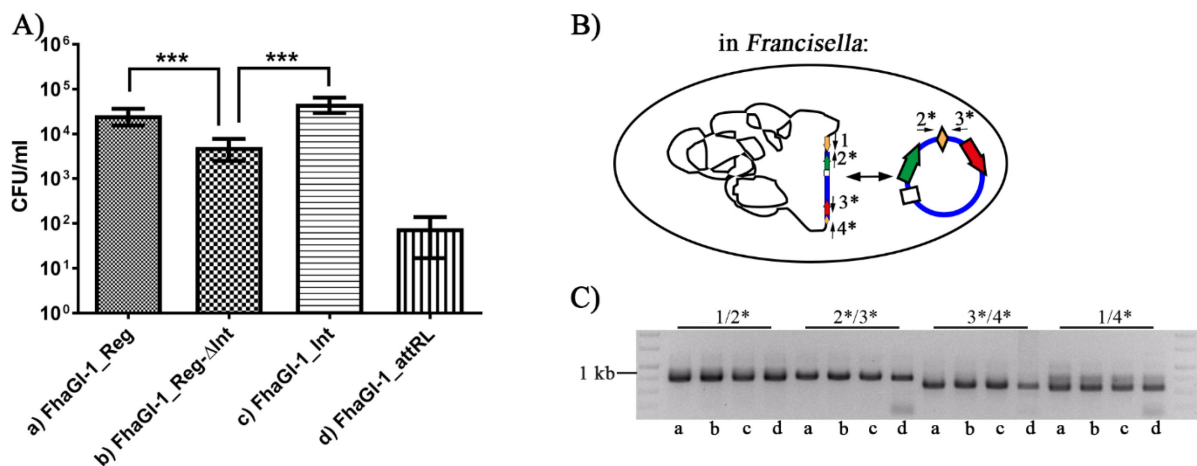


Abbildung 10: Analyse von Transformanden des Stammes Fth LVS mit verkürzten Konstrukten von FhaGI 1. A) CFU/ml nach Elektroporation von 1 µg Plasmidpräparation der verkürzten Konstrukte in den Stamm *Fth* LVS und Selektion auf HCA-Agar mit Kanamycin. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von 3 unabhängigen Versuchen. ***, $p < 0,001$, Student's T-test. B) Mögliche Formen der verkürzten Konstrukte nach erfolgreicher Transformation in *Fth* LVS. Ein orangener Pfeil steht für die tRNA^{Val}, ein grüner Pfeil für die KmR; ein weißes Rechteck steht für den Promotor GroES, die ortsspezifische Integrase wird durch einen roten Pfeil dargestellt und die *attR*-Stelle durch eine orangene Raute. Eine blaue Linie steht für den Bereich der Konstrukte, der die episomale Form bildet. Pfeile mit Ziffern zeigen die Lokalisation und Orientierung spezifischer Primer. C) PCR-Analyse von Transformanden mit FhaGI-1_Reg (a), FhaGI-1_Reg-ΔInt (b), FhaGI-1_Int (c) und FhaGI-1_attRL (d). Primer 2*/3* (Fha-2*/Fha-3*; Produkt: ca. 730 bp) zeigen die episomale Form und Primer 1/4* (Fha-1/ Fha-4*; Produkt: ca. 550 bp) die „leere“ chromosomale *attB*-Stelle. Die chromosomal integrierte Form der Konstrukte wird durch die Primerpaare 1/2* (Fha-1/ Fha-2*; Produkt: ca. 700 bp) und 3*/4* (Fha-3*/Fha-4*; Produkt: ca. 500 bp) nachgewiesen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der *E. coli* Transformanden zeigten sich bei den Transformanden des Stammes *Fth* LVS unter den gewählten Bedingungen keine Unterschiede in der Intensität der PCR-Banden. Allerdings wurde mit der DNA der *Francisella*-

Transformanden auch keine semiquantitative PCR durchgeführt. Zusammen mit den Ergebnissen der Transformationseffizienz konnte damit gezeigt werden, dass die Integrase zusammen mit den *att*-Stellen sowohl für die Bildung der episomalen Form als auch die Integration in das Genom ausreichend und für einen effizienten Ablauf dieser Prozesse auch notwendig ist.

3.1.2 Die tRNA^{Val} als Integrationsort in *Francisella*

Es ist bekannt, dass tRNA-Gene häufig als Integrationsort für mobile Elemente dienen (Reiter et al., 1989). Um zu überprüfen, ob das tRNA^{Val}-Gen bei Francisellen als genereller Integrationsort für GIs fungiert, wurden die vorhandenen Genomsequenzen auf das Vorhandensein von Repeat-1 untersucht. Unter denen in der Datenbank NCBI hinterlegten Genomen fanden sich für den Stamm *Fph* ATCC 25017 zwei verschiedene Genomsequenzen, die im Folgenden als *Fph* ATCC 25017[#] und *Fph* ATCC 25017^{**} bezeichnet werden. Bei den meisten der untersuchten *Francisella*-Genome ist zwar das tRNA^{Val}-Gen aber nicht Repeat-1 zu finden.

Tabelle 12: Das tRNA^{Val} Gen als Integrationsort in *Francisella*.

tRNA-Val	ACTCGCATAGCTCAGTTGGTTAGAGTACTACCTTGACATGGTAGGGGTCAGTGGTTCGAATCCAGTTGCGAGTACCA
Fhis 3523	repeat-1 CCTTGACATGGTAGGGGTCAGTGGTTCGAATCCAGTTGCGAGTACCA ^x
Fph 25017 ^{**}	repeat-1* CTTGtaATGGTttcacTaAaTaGgTataATCCAGTTGCGAGTACCA
Fph 25016	repeat-1* CTTGtaATGGTttcacTaAaTaGgTataATCCAGTTGCGAGTACCA
Fph GA01	repeat-1* CTTGcaATGGTttcacTaAaTaGgTataATCCAGTTGCGAGTACCA
Fph 25018	repeat-1* CTTGtaATGGTttcacTaAaTaGgTataATCCAGTTGCGAGTACCA
Fno DR83	repeat-1* CTTGtaATGGTttcacTaAaTaGgTataATCCAGTTGCGAGTACCA
Fno DPG	repeat-1* CTTGtaATGGTttcacTaAaTaGgTataATCCAGTTGCGAGTACCA
Fph 25015	ACTCGCATAGCTCAGTTGGTTAGAGTACTATCTTGACATGGTAGGGGTCAGTGGTTCGAATCCAGTTGCGAGTACCA ^x
Fph 25017 [#]	ACTCGCATAGCTCAGTTGGTTAGAGTACTATCTTGACATGGTAGGGGTCAGTGGTTCGAATCCAGTTGCGAGTACCA ^x
Fth LVS	ACTCGCATAGCTCAGTTGGTTAGAGTACTACCTTGACATGGTAGGGGTCAGTGGTTCGAATCCAGTTGCGAGTACCA ^x
Fno Fx1	ACTCGCATAGCTCAGTTGGTTAGAGTACTACCTTGACATGGTAGGGGTCAGTGGTTCGAATCCAGTTGCGAGTACCA ^x
Fno U112	ACTCGCATAGCTCAGTTGGTTAGAGTACTACCTTGACATGGTAGGGGTCAGTGGTTCGAATCCAGTTGCGAGTACCA ^x

^xkein Repeat vorhanden; Nukleotide, die sich von Repeat-1 unterscheiden, sind in Rot dargestellt (verändert nach Rydzewski et al., 2015).

In Tabelle 12 ist dies für die Stämme *Fth* LVS, *Fph* ATCC 25015, *Fph* ATCC 25017[#], *Fno* Fx1 und *Fno* U112 dargestellt. Bei den Stämmen *Fph* ATCC 25017^{**}, GA01-2801, ATCC 25018, ATCC 25016, *Fno* FAI DR83 und *Fno* DPG 3A-IS konnte allerdings eine alternative Variante von Repeat-1, die im Folgenden Repeat-1* genannt wurde, nachgewiesen werden. Repeat-1* weist gegenüber Repeat-1 Unterschiede in 12 Basen auf, die in Tabelle 12 in Rot dargestellt sind. Das in dem Stamm *Fph* GA01-2801 gefundene Repeat unterscheidet sich außerdem in einer Base von Repeat-1*. An der fünften Position ist hier ein Cytosin anstelle eines Thymin zu finden. In Tabelle 12 ist diese Base in grün dargestellt.

3.1.2.1 Genominseln in *Francisella philomiragia*

In den zuvor genannten Stämmen wurde die Region zwischen der tRNA^{Val} und Repeat-1* genauer untersucht. Dabei wurde eine putative GI, genannt FphGI-1, identifiziert. Wie in Abbildung 11 schematisch gezeigt ist, besteht FphGI-1 des Stammes *Fph* ATCC 25017** aus 18 ORFs, die zusammen eine Größe von 23.653 bp aufweisen. Die GI ist zwischen den Genen Fphi_1820 und Fphi_1839 lokalisiert. Anders als bei FhaGI-1 befindet sich das für die Phagenintegrase kodierende Gen (roter Pfeil, Fphi_1821) neben der tRNA^{Val} und ist in die gleiche Richtung wie diese orientiert. Direkt vor dem Integrasegen befinden sich in dieser GI zwei Wiederholungen einer kurzen Repeat-Sequenz mit der Basenfolge „ATGGTATCC“ (orangene Dreiecke vor Fphi_1821). Für die Gene Fphi_1822 bis Fphi_1825 ist keine Funktion bekannt. Die Gene Fphi_1826 bis Fphi_1836 jedoch kodieren für Gene, die potentiell an Replikation und Konjugation beteiligt sind.

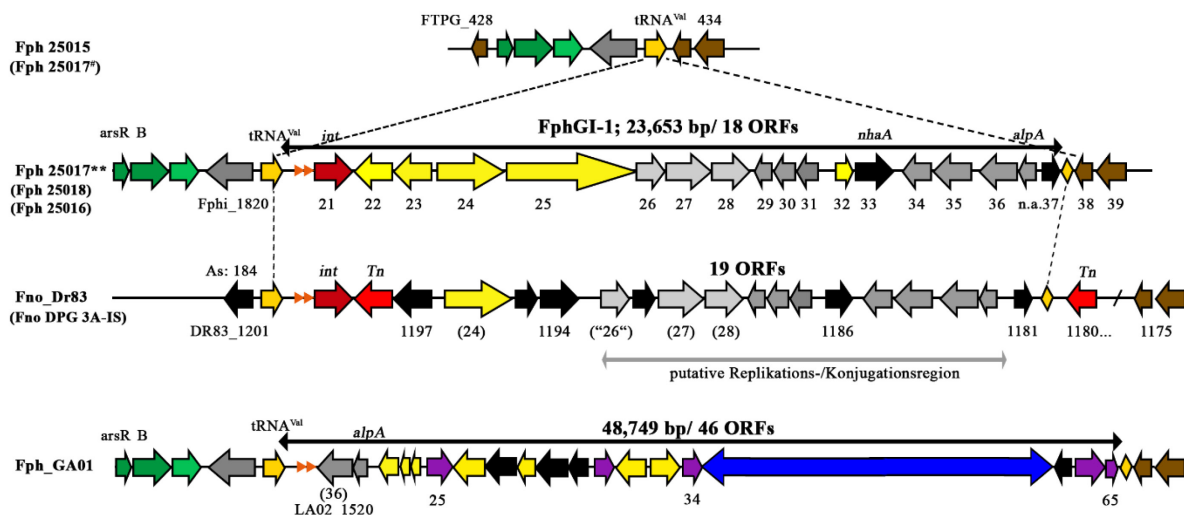


Abbildung 11: Integrationsort und Organisation der Genominsel 1 aus *F. philomiragia* (FphGI-1). Die GI liegt in das tRNA^{Val}-Gen (orangener Pfeil) integriert vor. Das 3'-Ende der GI, Repeat-1* (*attR*) ist als eine orangene Raute gezeigt. Gene unbekannter Funktion werden durch gelbe Pfeile und Gene, die putativ an der Replikation/Konjugation beteiligt sind, als graue Pfeile dargestellt. Die ortsspezifische Integrase ist durch einen roten Pfeil indiziert und hellrote Pfeile stehen für Transposasen. Gene mit einer Integrase-„core“-Domäne sind als violette Pfeile dargestellt. Grüne Pfeile stehen für Gene einer Arsenresistenz. Eine kurze Repeat-Sequenz, bestehend aus den Basen „ATGGTATCC“, ist als orangenes Dreieck gezeigt. Ein blauer Doppelpfeil steht für die Gene LA02_1535-66. Gennummern sind unter und einige Gennamen über den Pfeilen angegeben. Die in Klammern angegebenen Gennummern beziehen sich auf homologe Gene des Stammes *Fph* 25017**. Referenznummern für Genome siehe 2.1.2 (verändert und erweitert nach Rydzewski et al., 2015).

Die GIs in den Stämmen *Fph* ATCC 25016 und *Fph* ATCC 25018 unterscheiden sich in ihrem Aufbau nicht von FphGI-1, und die vorhandenen Gene sind auf Nukleotidebene ebenfalls identisch. Im Stamm *Fph* ATCC 25016 ist die GI zwischen den Genen BF30_77 und BF30_97 lokalisiert und im Stamm *Fph* ATCC 25018 befindet sie sich zwischen den Genen KU46_1453 und KU46_1474. In den Stämmen *Fno* FAI DR83 und *Fno* DPG 3A-IS wurde ebenfalls eine GI gefunden, die in ihrem Aufbau FphGI-1 ähnelt, jedoch 19 ORFs aufweist. Die GI liegt in diesen Stämmen zwischen den Genen DR83_1200 und DR83_1180 (DR83) bzw. CH70_1224 und CH70_1244 (DPG). In Abbildung 11 sind bei der GI des Stammes *Fno* FAI DR83 für einige Gene die Gennummern der homologen Gene von FphGI-1 in Klammern angegeben.

Tabelle 13: Gene von FphGI-1 und Vergleich mit Genen der GI von *Fno* DR83

Gen (Fphi_Nr.)	Amino- Säuren	Motive oder putative Funktion	DR83 % AS-Ident.
tRNA ^{Val}			100*
1821	398	Phagenintegrase, Int_P4_C,	100
1822	408	48.4 kDa, kein Homolog	-
1823	581	69.5 kDa, kein Homolog	-
1824	892	103.2 kDa, Pfam_MTF_26, SAM, R-M	74
1825	1030	121.4 kDa, kein Homolog in <i>Francisella</i>	-
1826	331	toxin_Fic, Virulenz_RhuM	+
1827	641	DEAD-ähnliche Helikase, ABC_ATPase	93
1828	398	GIY-YIG Nukleasedomäne SF	96
1829	96	HTH_XRE	99
1830	106	Plasmidstabilisation SF, Gp49	100
1831	168	ArdA, anti-Restriktionsprotein	96
1832	68	8.1 kDa, Homolog in <i>Legionella</i>	-
1833	447	NhaA, N ⁺ /H ⁺ Antiporter, TM	-
1834	240	27.8 kDa, TriL	92
1835	671	SXT_TraD, TraG-D_C, BrbB,	94
1836	416	DUF3294	98
1931	66	Alpa, HTH_MerR SF, Stressantwort	100
1837	77	HTH_XRE,	-
Repeat			100*

* = bp-Identität; AS = Aminosäuren; DR83 = *Fno* FAI DR83; SF = Superfamilie; TM = Transmembrandomäne (Rydzewski et al., 2015)

Eine Liste der Gene von FphGI-1 mit identifizierten Motiven der kodierten Proteine sowie möglichen Funktionen ist in Tabelle 13 aufgeführt. Ebenfalls aufgeführt ist die

Aminosäureidentität der in den GIs der Stämme *Fno* DR83 und *Fno* DPG 3A-IS kodierten Proteine. Auf Proteinebene weisen sowohl die Integrase als auch die Proteine der putativen Replikations-/Konjugationsregion Identitäten zwischen 100 % und 92 % zu den Proteinen von FphGI-1 auf. Interessanter Weise zeigte ein Sequenzabgleich auf Proteinebene keine signifikante Übereinstimmung zwischen der Integrase von FphGI-1 und der Integrase von FhaGI-1 (Sequenzalignement siehe Anhang, S. 121), obwohl beide GIs den gleichen Integrationsort im Genom aufweisen.

Im Stamm *Fph* GA01-2801 unterscheidet sich der Bereich zwischen der tRNA^{Val} und Repeat-1* deutlich von FphGI-1. Er umfasst insgesamt 48.749 bp mit 46 ORFs und ist zwischen den Genen LA02_1818 und LA02_1866 lokalisiert. Neben der kurzen Repeat-Sequenz konnten nur für die Gene LA02_1820 und LA02_1821 auf Proteinebene Homologien zu den Genen Fphi_1536 (98 %) und *alpA* (98 %) von FphGI-1 nachgewiesen werden. Ein Gen, welches Homologien zu der Phagenintegrase von FphGI-1 aufweist, konnte in diesem Stamm nicht identifiziert werden. Es existieren jedoch einige Gene mit einer Integrase-„core“-Domäne (violette Pfeile). Die Gene LA02_1835-66 weisen Homologien zu einem Gencluster des Stammes *Fph* ATCC 25017 auf, welches sich jedoch nicht auf FphGI-1 befindet, sondern durch die Gene Fphi_0037-0069 kodiert wird (vollständige Liste der Gene siehe Anhang, Tabelle 15).

3.1.2.2 Funktionalität von FphGI-1

Laut der Genomdaten sollten die Stämme *Fph* ATCC 25016 und *Fph* ATCC 25018 eine GI in ihrem Genom enthalten. Beide Stämme standen für Untersuchungen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung und wurden mit FphGI-1-spezifischen Primern genauer untersucht. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der PCR-Analysen mit genomischer DNA beider Stämme. Um auszuschließen, dass die Ergebnisse durch die Menge der eingesetzten DNA beeinflusst werden, wurden jeweils sowohl 1 µg (1) als auch 100 ng (0,1) DNA und 40 Amplifikationszyklen eingesetzt. Es ist zu sehen, dass die Menge der eingesetzten DNA keinen Einfluss auf die Ergebnisse der PCRs hatte. Bei beiden Stämmen konnte die integrierte Form der GI mittels der Primerkombinationen FphGI-1/FphGI-2 (1/2) und FphGI-3/FphGI-4 (3/4) nachgewiesen werden. Allerdings entstand mit den Primern FphGI-2 und FphGI-3 (2/3) kein Produkt. Die Existenz einer episomalen Form der GI konnte damit nicht nachgewiesen werden. Auch mit der Primerkombination FphGI-1/FphGI-4 (1/4) entstand kein Produkt. Dies weist darauf hin, dass die GI im Genom integriert vorliegt, jedoch nicht exzidiert wird. Der

Bereich zwischen den beiden Bindungsstellen der Primer ist in diesem Fall zu groß (~23,6 kb), um durch die hier angewendeten PCR-Bedingungen nachgewiesen werden zu können.

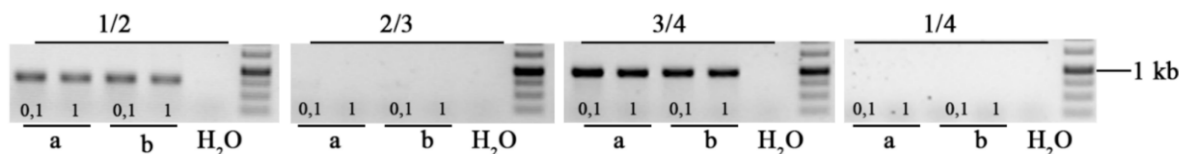


Abbildung 12: PCR-Überprüfung der Stämme *Fph* ATCC 25016 und *Fph* ATCC 25018 auf das Vorhandensein und die Funktionalität von *FphGI-1*. Die chromosomal integrierte Form der GI wird durch die Primerpaare 1/2 (*FphGI-1*/*FphGI-2*; Produkt: ca. 750 bp) und 3/4 (*FphGI-3*/*FphGI-4*; Produkt: ca. 1000 bp) nachgewiesen. Primer 2/3 (*FphGI-2*/*FphGI-3*; Produkt: ca. 500 bp) zeigen die episomale Form und Primer 1/4 (*FphGI-1*/*FphGI-4*; Produkt: ca. 1000 bp) die „leere“ chromosomale *attB*-Stelle. Es wurden jeweils 1 µg (1) und 100 ng (0,1) genomische DNA in die PCRs eingesetzt und 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. H₂O: Wasserkontrolle.

3.1.3 Die Rolle der Integrase und des Repeats

Die Untersuchung von *FphGI-1* hat gezeigt, dass die GI anscheinend in das Genom der untersuchten Stämme integriert ist aber keine episomale Form gebildet wird. Da *FphGI-1* genau wie *FhaGI-1* in das tRNA^{Val}-Gen integriert ist, stellt sich die Frage, welche Ursachen der fehlenden episomalen Form zu Grunde liegen. Eine Möglichkeit wäre, dass die in *FphGI-1* vorhandene Integrase nicht funktional ist. Ein weiterer Grund könnte Repeat-1* mit seinen 12 veränderten Basen sein. Um diese Möglichkeiten zu überprüfen, wurden neue synthetische Konstrukte hergestellt. Eine schematische Darstellung dieser Konstrukte ist in Abbildung 13 A zu sehen. Als „Nullkontrolle“ wurde das bereits zuvor verwendete Konstrukt *FhaGI-1_attRL* (a) mitgeführt. Zur Überprüfung der Funktionalität der Integrase von *FphGI-1* wurde das Konstrukt *FhaGI-1_Int_{Fph}* (b), bei dem die Integrase von *FhaGI-1* durch die von *FphGI-1* ausgetauscht ist, hergestellt. Die Auswirkung, die Repeat-1* auf die Bildung der episomalen Form hat, sollte mit dem Konstrukt *FhaGI-1_Reg-attR_{Fph}* (c) untersucht werden. *FhaGI-1_Reg-attR_{Fph}* gleicht in seinem Aufbau *FhaGI-1_Reg*, bis auf die *attR*-Stelle, die gegen Repeat-1* ausgetauscht wurde. Als zusätzliche Kontrollen wurden die Konstrukte *FhaGI-1_Reg* (d) und *FhaGI-1_Reg-ΔInt* (e) mitgeführt. Die Positionen der Primer, die für den Nachweis der episomalen Form verwendet wurden, sind durch Pfeile mit Ziffern gekennzeichnet. Da der Primer *Fha-3** in dem Integrasegen positioniert ist, wurde dieser für das Konstrukt *FhaGI-1_Int_{Fph}* durch den Primer *Fha-3^{Fph}* ausgetauscht.

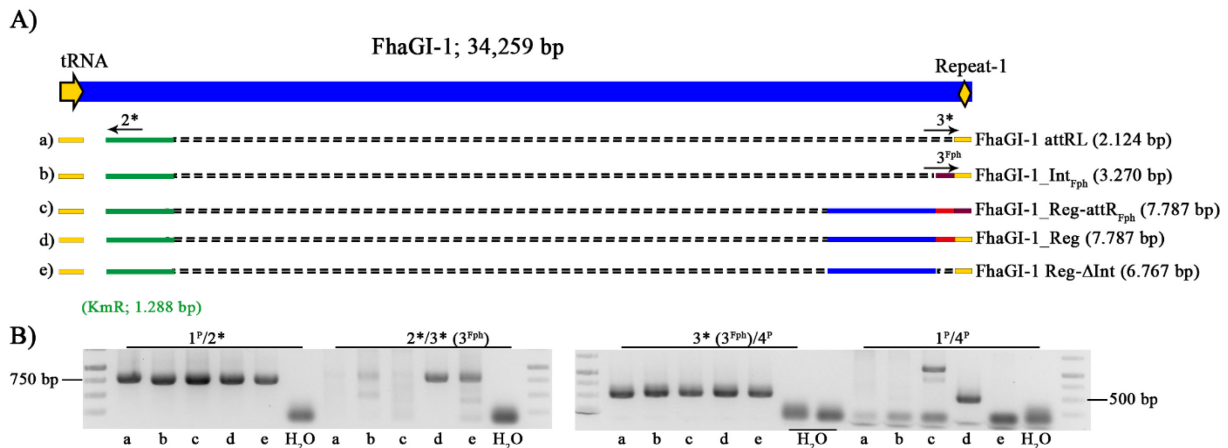


Abbildung 13: Analyse der Funktionalität verkürzter synthetischer Konstrukte in *E. coli*. A) Aufbau der Konstrukte FhaGI-1_attRL (a), FhaGI-1_Int_{Fph} (b), FhaGI-1_Reg-attR_{Fph} (c), FhaGI-1_Reg (d) und FhaGI-Reg-ΔInt (e). orange: tRNA^{Val} sowie *attR* von FhaGI-1; rot: ortsspezifische Integrase von FhaGI-1; braun: Integrase und *attR* von FphGI-1; grün: KmR; blau: regulatorische Gene. Pfeile mit Ziffern stehen für Lokalisation und Orientierung spezifischer Primer. B) PCR-Analyse von *E. coli*-Transformanten mit FhaGI-1_attRL (a), FhaGI-1_Int_{Fph} (b), FhaGI-1_Reg-attR_{Fph}, FhaGI-1_Reg (d) und FhaGI-1_Reg-ΔInt (d). Die Primer 2*/3* bzw. 3^{Fph} (Fha-2*/ Fha-3* bzw. Fha-3^{Fph}; Produkt: ca. 730 bp) zeigen die episomale Form und die Primer 1^P/4^P (Fha-1^P/Fha-4^P; Produkt: ca. 550 bp) zeigen den „leeren“ Vektor mit der *attB*-Stelle. Die Primerkombinationen 1^P/2* (Fha-1^P/Fha-2*; Produkt: ca. 670 bp) und 3* bzw. 3^{Fph}/4^P (Fha-3* bzw. Fha-3^{Fph}/Fha-4^P; Produkt: ca. 450 bp) demonstrieren die integrierte Form der Konstrukte. H₂O: Wasserkontrolle.

3.1.3.1 Funktionalität in *E. coli*

Zunächst wurden die Konstrukte in *E. coli* transformiert und durch PCR-Analysen auf ihre Funktionalität hin untersucht. Als Kontrollen für die korrekte Bildung der episomalen Form und die Integration wurden die Konstrukte FhaGI-1_Reg und FhaGI-1_RegΔInt mitgeführt. Wie in Abbildung 13 B zu sehen ist, konnte für alle Konstrukte die in den Vektor integrierte Form nachgewiesen werden (1^P/2* und 3* (3^{Fph})/4^P, Spuren a-e). Die episomale Form konnte hingegen nur bei den beiden zur Kontrolle mitgeführten Konstrukten FhaGI-1_Reg und FhaGI-1_RegΔInt deutlich nachgewiesen werden (2*/ 3* (3^{Fph}), Spuren d und e). Bei den Konstrukten FhaGI-1_attRL, FhaGI-1_Int_{Fph} und FhaGI-1_Reg-attR_{Fph} ist hingegen keine oder nur eine schwache Bande auf der erwarteten Höhe von 730 bp zu erkennen (Spuren a-c), die bei FhaGI-1_Int_{Fph} etwas deutlicher zu erkennen ist (Spur b). Mit der Primerkombination Fha-1^P/Fha-4^P ist bei dem Konstrukt FhaGI-1_Reg eine deutliche Bande auf der erwarteten Höhe von 500 bp zu erkennen (1^P/4^P, Spur d). Während für die Konstrukte FhaGI-1_attRL

und FhaGI-1_Int_{Fph} keine Bande der richtigen Größe zu sehen ist (Spuren a und b), fällt diese bei FhaGI-1_Reg-attR_{Fph} stärker aus (Spur c). Allerdings sind auch zwei weitere Banden, die Produktgrößen von ungefähr 750 bp und knapp über 1000 bp entsprechen, zu sehen.

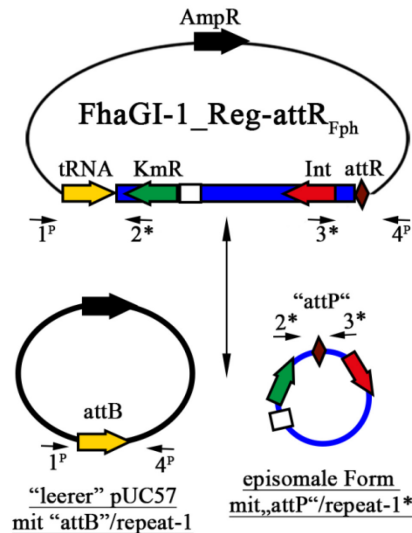


Abbildung 14: Schematische Darstellung der möglichen Formen von FhaGI 1_Reg-attR_{Fph}. Das komplette Konstrukt, integriert in den Vektor pUC57 mit tRNA^{Val} (mit attL) und attR-Stelle (Repeat-1*); die episomale Form mit der attP-Stelle (Repeat-1*), sowie der „leere“ pUC57-Vektor mit der attB-Stelle (tRNA^{Val}). Ein orangener Pfeil steht für die tRNA^{Val} mit der Sequenz von Repeat-1, ein grüner Pfeil für die KmR; Rechteck steht für den Promotor GroES, die ortsspezifische Integrase wird durch einen roten Pfeil dargestellt und die attR-Stelle mit der Sequenz von Repeat-1* durch eine braune Raute. Eine blaue Linie steht für den Bereich der Konstrukte, der die episomale Form bildet. Pfeile mit Ziffern stehen für Lokalisation und Orientierung spezifischer Primer.

Die PCR-Produkte aller zuvor beschriebenen Analysen wurden für alle Konstrukte sequenziert und anschließend auf ihre Richtigkeit überprüft. Für die Konstrukte FhaGI-1_attRL und FhaGI-1_Reg-Int_{Fph} lagen alle Sequenzen in korrekter Form vor. Bei dem Konstrukt FhaGI-1_Reg-attR_{Fph} wurde besonderes Augenmerk auf die Sequenz des Repeats gelegt. Es wurde erwartet, dass die Sequenz von Repeat-1* sowohl bei der episomalen Form (Primer 2*/3*), als auch am 3'-Ende der in den Vektor integrierten Form (Primer 3*/4^P) nachweisbar ist. Am 5'-Ende der in den Vektor integrierten Form (Primer 1^P/2*) sowie bei dem „leeren“ Vektor (Primer 1^P/4^P) sollte Repeat-1 zu finden sein (siehe Abbildung 14). Die Sequenzierungen zeigten, dass sowohl für die integrierte Form als auch die episomale Form die Sequenzen den Erwartungen entsprechen und Repeat-1* an den erwarteten Positionen gefunden wird. Die zuvor beschriebenen drei Produkte der PCR mit Primerpaar Fha-1^P/Fha-4^P wurden ebenfalls sequenziert. Dabei zeigte sich, dass die Sequenz des Produktes mit 550 bp

der des „leeren“ Vektors mit der *attB*-Stelle entspricht und wie erwartet Repeat-1 enthält. Es ist jedoch anzumerken, dass genau in dem Bereich der tRNA, der dem Repeat entspricht, die Basenzuordnung nicht 100 % eindeutig ist. So ist in dem Sequenzdiagramm zu erkennen, dass sich hier auch die Basen von Repeat-1* finden (Abbildung 15, unterstrichener Bereich). Die Sequenzierung der anderen beiden Produkte ergab, dass hier neben dem Anfang der tRNA^{Val} auch Teile der Sequenz des Integrases zu finden sind. Der Unterschied zwischen den beiden Sequenzen besteht darin, dass bei dem 1000 bp Produkt ein größerer Teil des Integrases zu finden ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Exzision des Konstruktes FhaGI-1_Reg-attR_{Fph} aus dem pUC57-Vektor nicht ortspezifisch abläuft.



Abbildung 15: Sequenzdiagramm der Sequenzierung des 550 bp Produktes des Konstruktes FhaGI-1_Reg-attR_{Fph} mit Primern Fha-1^P/Fha-4^P. Gezeigt ist der Ausschnitt der Sequenz, der der tRNA^{Val} entspricht. Unterstrichen ist der Sequenzbereich, in dem die Basen zwischen Repeat-1 und Repeat-1* variieren.

3.1.3.2 Funktionalität in *Francisella*

Jeweils 1 µg Plamid-DNA der verschiedenen Konstrukte wurde in den Stamm *Fth* LVS elektroporiert und wie unter 2.2.9 die Transformationseffizienz bestimmt. Als Positiv- und Negativkontrollen der Transformation wurden auch die Plasmidpräparationen der Konstrukte FhaGI-1_Reg und FhaGI-1_attRL in den Stamm *Fth* LVS elektroporiert. Wie in Abbildung 16 A zu erkennen ist, unterscheidet sich das Konstrukt FhaGI-1_Reg-attR_{Fph} (c) nicht von FhaGI-1_Reg (d) in seiner Transformationseffizienz. FhaGI-1_Int_{Fph} (b) hingegen gleicht in seiner Transformationseffizienz FhaGI-1_attRL (a), was bedeutet, dass sie gegenüber den anderen Konstrukten deutlich reduziert ist. Beide weisen nur ungefähr 10² CFU/ml auf, während es bei den anderen Konstrukten fast 10⁵ CFU/ml sind. Besonders bei der Transformation mit FhaGI-1_Int_{Fph} waren starke Schwankungen der Transformationseffizienz zu beobachten.

Im Anschluss an die Transformation wurde von jeweils zwei Transformanten jeden Konstruktes genomische DNA isoliert und diese mittels PCR genauer untersucht. Als Kontrollen wurde genomische DNA der Stämme *Fth* LVS FhaGI-1_attRL, *Fth* LVS FhaGI-1_Reg und *Fth* LVS FhaGI-1_Reg- Δ Int mitgeführt (Abbildung 16 B). Für das Konstrukt FhaGI-1_attRL konnten für beide untersuchten Transformanten wie in den vorangegangenen Versuchen sowohl die integrierte als auch die episomale Form nachgewiesen werden (1/2 und 3/4 sowie 2/3, a).

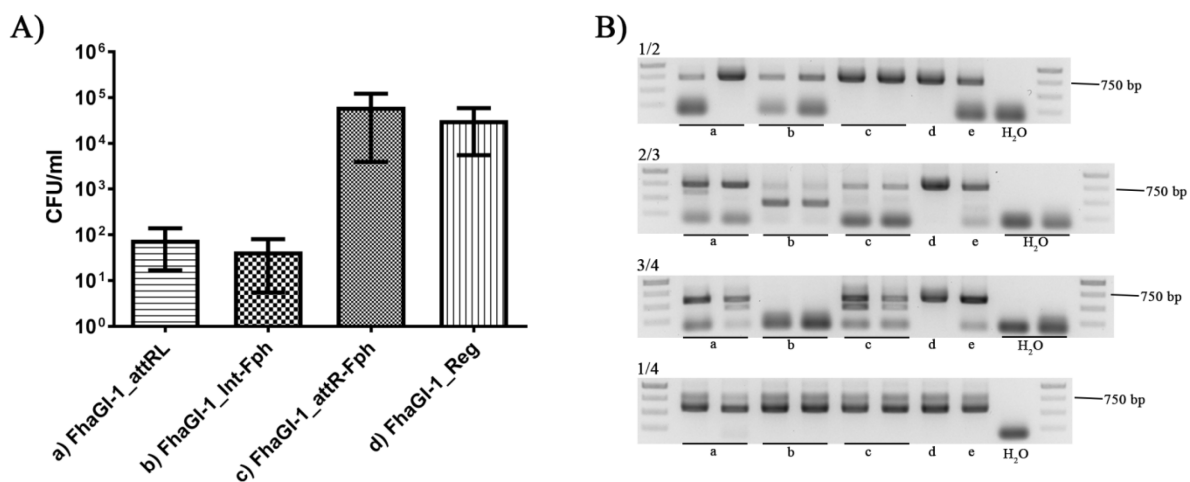


Abbildung 16: Untersuchung von Transformanten des Stammes *Fth* LVS. A) CFU/ml nach Elektroporation von 1 μ g Plasmid-DNA der verkürzten Konstrukte in den Stamm *Fth* LVS und Selektion auf HCA-Agar mit Kanamycin. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängigen Versuchen. B) PCR-Analyse von Transformanten mit FhaGI-1_attRL (a), FhaGI-1_Int_{Fph} (b), FhaGI-1_Reg-attR_{Fph} (c), FhaGI-1_Reg (d) und FhaGI-1_Reg- Δ Int (d). Primer 2/3 (Fha-2*/Fha-3* bzw. Fha-3^{Fph}; Produkt: ca. 730 bp) zeigen die episomale Form und Primer 1/4 (Fha-1/Fha-4*; Produkt: ca. 550 bp) die „leere“ chromosomale attB-Stelle. Die chromosomal integrierte Form der Konstrukte wird durch die Primerpaare 1/2 (Fha-1/ Fha-2*; Produkt: ca. 700 bp) und 3/4 (Fha-3* bzw. Fha-3^{Fph}/Fha-4*; 500 bp) nachgewiesen. H₂O: Wasserkontrolle.

Bei den Transformanten des Konstruktes FhaGI-1_Int_{Fph} zeigt sich ein anderes Bild. Zwar kann mit dem Primerpaar Fha-1/Fha-2* die Integration des 5'-Endes des Konstruktes nachgewiesen werden (1/2, b), jedoch ist mit dem Primerpaar Fha-3^{Fph}/Fha-4* kein Produkt nachweisbar und damit auch nicht die Integration des 3'-Endes (3/4, b). Bei der Überprüfung der Bildung der episomalen Form wurde nicht nur ein Produkt der erwarteten Größe von 730 bp detektiert, sondern auch eine wesentlich deutlichere Bande bei einer Größe von ca. 550 bp. Für die Transformanten des Konstruktes FhaGI-1_Reg-attR_{Fph} konnten sowohl die integrierte als auch die episomale Form gezeigt werden (1/2 und 3/4 sowie 2/3, c). Allerdings

Consensus TTTTAAAGCCTTGACATGGTAGGGGGTCACTGGTTCGAATCCAGTTGCGAGTACCAGTAATTTT

Coverage 2 0

REV attR-Fph ob... TTTTAAAGCCTTGACATGGTAGGGGGTCACTGGTTCGAATCCAGTTGCGAGTACCAGTAATTTT

FWD attR-Fph ob... TTTTAAAGCCTTGACATGGTAGGGGGTCACTGGTTCGAATCCAGTTGCGAGTACCAGTAATTTT

Auch die PCR-Produkte der Analysen der anderen Konstrukte wurde durch Sequenzierung kontrolliert und auf ihre Richtigkeit überprüft. Für alle konnte die korrekte Sequenz nachgewiesen werden.

3.2 FhaGI-1 als ortsspezifischer Integrationsvektor

Ein ortsspezifischer Integrationsvektor basierend auf einem *Francisella*-spezifischen Phagen ist bisher nicht beschrieben. Für andere Bakterienspezies sind solche Vektoren jedoch ein bekanntes und oft eingesetztes System (Lee et al., 1991; Hoang et al., 2000; Lauer et al., 2002).

3.2.1 Überprüfung des Konzepts mit einem ersten Konstrukt

Ausgehend von den Untersuchungen zur Funktionalität von FhaGI-1, die gezeigt haben, dass die Integrase zusammen mit den *att*-Stellen ausreichend für die ortsspezifische Integration und Exzision ist, sollte ein ortsspezifischer Integrationsvektor für die Nutzung in *Francisella* entwickelt werden. Um zu testen, ob sich FhaGI-1 als Grundlage für einen solchen Vektor eignet, wurde ein erstes Konstrukt, pFhaGI-gfp-CmR (7681 bp) genannt, erstellt und synthetisch hergestellt. Abbildung 18 zeigt eine schematische Darstellung des Konstruktes, das aus folgenden Teilen besteht: 1) der *attL*-Stelle (tRNA^{Val}), dem generellen Integrationsort von FhaGI-1; 2) einem *gfp*-Gen, welches als Platzhalter für künftig integrierte Gene und zur Überprüfung der Expression während der intrazellulären Replikation dienen soll. Flankiert wird das Gen auf beiden Seiten von Restriktionsschnittstellen für NotI, BclI, SnaBI und NotI, and SacI; 3) dem Promotor GroES des Stammes *Fth* LVS (Ericsson et al., 1997); 4) dem PRE*-Element (dem *iglC*-Promotor mit einer PRE-site), das für die Expression von Genen während der intrazellulären Replikation von *Francisella* in Wirtszellen genutzt wird (Ramsey et al., 2015); 5) dem Promotor GroES des Stammes *Francisella* W12-1067 (pGroEs-W12), der für die Expression von Genen in dieser Spezies genutzt werden soll; 6) einer Chloramphenicol-Resistenzkassette (CmR) unter Kontrolle des Promotors GroES, für die Selektion nach der Transformation von Francisellen; 7) der ortsspezifischen Integrase (FTN3523_1033), die für die Ausbildung der episomalen Form und die Integration in die *attB*-Stelle (tRNA^{Val}) des Akzeptorstammes notwendig ist; 8) der *attR*-Stelle, die für die Ausbildung der episomalen Form notwendig ist. Diese Elemente wurden in den Vektor pUC57-Kana integriert, um eine Amplifikation in *E. coli* zu ermöglichen (Details siehe 2.2.5.3, sowie Vektorkarte im Anhang, S. 126). Ausgehend von den Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung von FhaGI-1 (3.1.1) ist zu erwarten, dass nur der FhaGI-gfp-CmR-Teil des Vektors später in das Genom des Akzeptorstammes integriert wird.

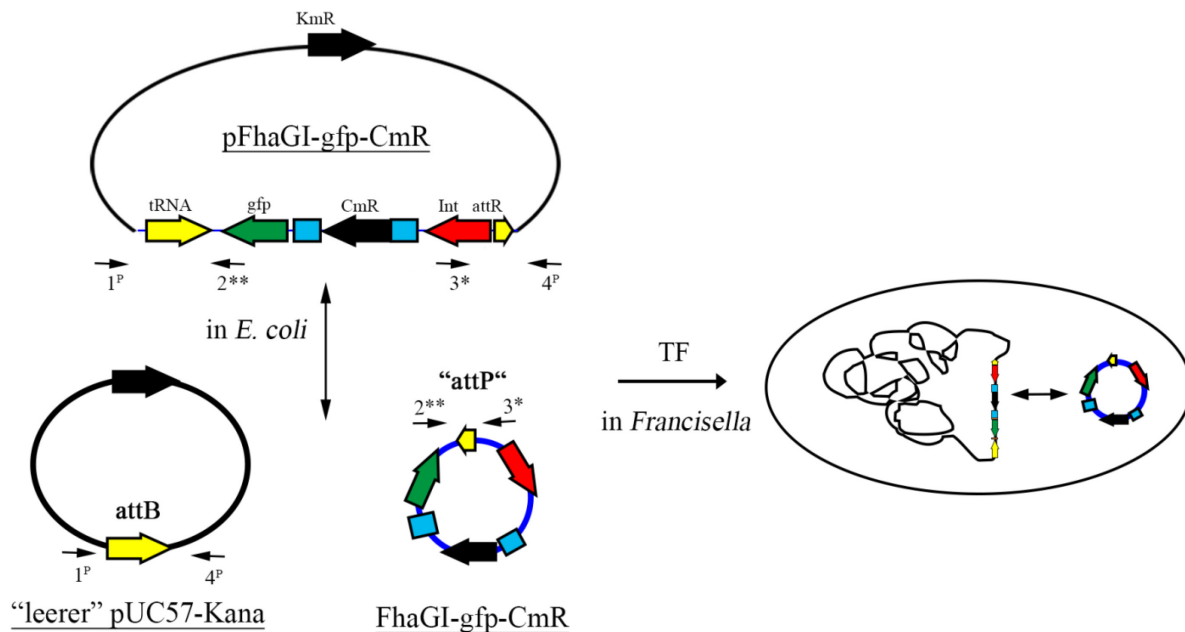


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Integrationssektors pFhaGI-gfp-CmR. In *E. coli* existieren drei Formen des Integrationsvektors: das komplette Konstrukt integriert in den pUC57-Kana-Vektor (pFhaGI-gfp-CmR), der „leere“ pUC57-Kana- Vektor mit der *attB*-Stelle und die episomale Form mit der *attP*-Stelle (FhaGI-gfp-CmR). Nach Transformation in *Francisella* liegt FhaGI-gfp-CmR entweder integriert in das Genom oder als episomale Form vor. Pfeile mit Ziffern geben Position und Orientierung von Primern an, die für die Detektion der verschiedenen Formen eingesetzt wurden. Gelb, *tRNA^{Val}* und *attR*-Stelle; grün, *gfp*-Gen; schwarz, Antibiotikaresistenzkassetten; rot, Integrase; blau, Promotorregionen; blaue Linie, Bereich des Vektors, der die episomale Form bildet; TF= Transformation. (Verändert nach Tlapák et al., 2018).

Das Konstrukt pFhaGI-gfp-CmR wurde zunächst durch chemische Transformation in *E. coli* eingebracht. Die nachfolgend isolierte Plasmid-DNA wurde mittels PCR auf das Vorhandensein der verschiedenen Formen hin untersucht. In Abbildung 18 sind die für diese Analyse genutzten Primer als Pfeile eingezeichnet. Mit den Primerkombinationen Fha-1^P/Fha-2^{**} und Fha-3^{*}/Fha-4^P wurde die integrierte Form (pFhaGI-gfp-CmR), mit Fha-2^{**}/Fha-3^{*} die episomale Form mit der *attP*-Stelle (FhaGI-gfp-CmR) und mit Fha-1^P/Fha-4^P der „leere“ pUC57-Kana-Vektor mit der *attB*-Stelle nachgewiesen. Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, liegen in *E. coli* alle drei Formen des Vektors vor. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Vektor auch im rekombinanten System funktional ist.

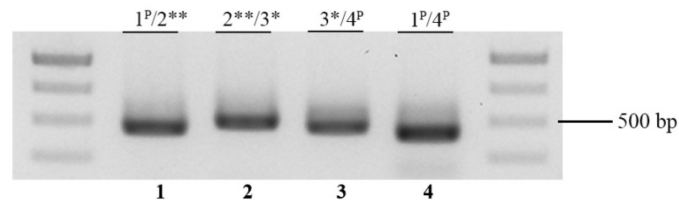


Abbildung 19: Analyse eines Transformanden mit pFhaGI-gfp-CmR. PCR-Analyse eines *E. coli*-Transformanden. Primer 2**/3* (Fha-2**/Fha-3*; Produkt: ca. 480 bp) zeigen die episomale Form und Primer 1^P/4^P (Fha-1^P/Fha-4^P; Produkt: ca. 400 bp) die „leere“ chromosomale *attB*-Stelle. Die integrierte Form der Konstrukte wird durch die Primerpaare 1^P/2** (Fha-1^P/Fha-2**; Produkt: ca. 430 bp) und 3*/4^P (Fha-3*/Fha-4^P; Produkt: ca. 450 bp) nachgewiesen (Tlapák et al., 2018).

Im nächsten Schritt wurde die Plasmid-DNA in den Stamm *Fth* LVS elektroporiert. Für die Selektion positiver Klone wurde eine Folge positiver und negativer Selektionsschritte auf HCA-Agar mit Cm und Km durchgeführt. Dabei sollten Klone, bei denen der Vektor erfolgreich integriert wurde, Cm-resistent und Km-sensitiv sein, da sie den „leeren“ pUC-Kana Vektor verlieren sollten. Wie in Abbildung 20 A exemplarisch dargestellt ist, führte diese Selektion zu ca. 30% an Klonen, die Cm-resistent aber Km-sensitiv waren.

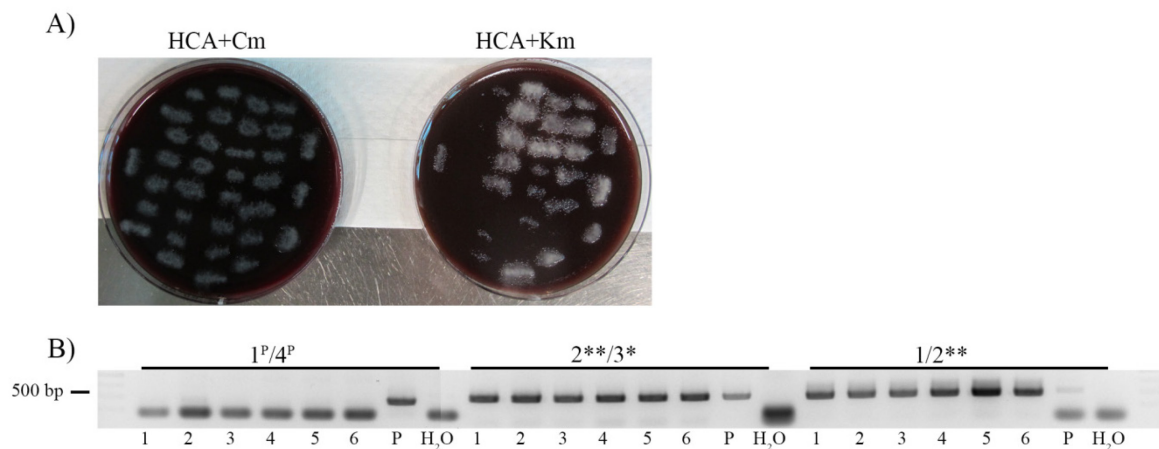


Abbildung 20: Positive und negative Selektion von *Fth* LVS Transformanden. A) Selektion Cm-resistenter und Km-sensitiver Transformanden auf HCA+Cm und HCA+Km. B) PCR-Analyse Cm-resistenter und Km-sensitiver Klone. Primer 1^P/4^P (Fha-1^P/Fha-4^P; Produkt: ca. 400 bp) zeigen den „leeren“ pUC57-Kana Vektor, Primer 2**/3* (Fha-2**/Fha-3*; Produkt: ca. 480 bp) zeigen die episomale Form und Primerpaare 1/2** (Fha-1/Fha-2**; Produkt: ca. 450 bp) die integrierte Form von pFhaGI-gfp-CmR.

Einige der so selektierten Klone wurden daraufhin mittels PCR weiter untersucht. In Abbildung 20 B ist zu sehen, dass sowohl die integrierte Form des Vektors (Primer Fha-1/Fha-2**) als auch die episomale Form (Primer Fha-2**/Fha-3*) vorhanden waren. Der

„leere“ pUC57-Kana Vektor konnte jedoch nicht mehr nachgewiesen werden (Primer Fha-1^P/Fha-4^P).

Da die Ergebnisse zeigten, dass das Konzept des Integrationsvektors funktioniert, wurde dieser durch MCS1 mit Restriktionsschnittstellen für AatII, BclI, NotI und SacI sowie MCS2 mit Restriktionsschnittstellen für EcoRV, KpnI, NcoI und NotI, die das *gfp*- Gen flankieren, optimiert. Das Konstrukt MCS_Neu (2389 bp) wurde über die Restriktionsschnittstellen SacII und SnaBI in pFhaGI-1 kloniert, was zu dem Vektor pFIV1-Val (*Francisella* Integrationsvektor tRNA^{Val}-spezifisch) führte (Abbildung 21). Eine vollständige Vektorkarte von pFIV1-Val sowie ein Fließschema der gesamten pFIV-Val-Vektorklonierung sind im Anhang aufgeführt (siehe S. 127 und Abbildung 44).

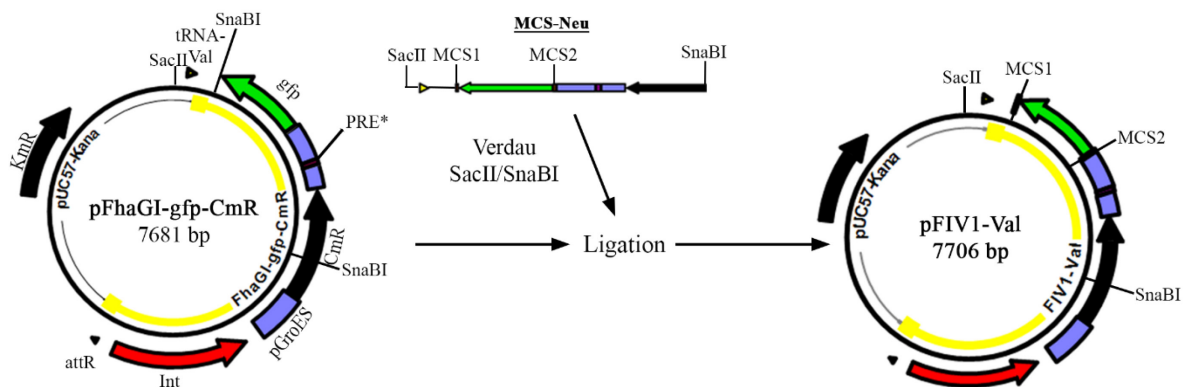


Abbildung 21: Generierung des Integrationsvektors pFIV1-Val. Es sind Vektorkarten und das Restriktionsfragment gezeigt, das für die Konstruktion von pFIV1-Val eingesetzt wurde. Antibiotikaresistenzkassetten für Kanamycin (KmR) und Chloramphenicol (CmR) sind in schwarz gezeigt; Dreiecke repräsentieren die tRNA^{Val} und die attR-Stelle; Promotoren sind in blau dargestellt und das Integrasegen in rot; das *gfp*-Gen ist in grün dargestellt. Der FIV-Val-Teil der Vektoren, der in das Genom von *Francisella*-Transformanden integriert, ist durch eine gelbe Linie hervorgehoben. Genutzte Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. (Verändert nach Tlapák et al., 2018).

3.2.2 Funktionale Charakterisierung von pFIV1-Val

Die Funktionalität des optimierten Vektors pFIV1-Val sollte im Folgenden genauer untersucht werden. Dazu sollte zunächst eine $\Delta iglC$ -Deletionsmutante des Stammes *Fth* LVS, von der bekannt ist, dass sie sich nicht mehr intrazellulär vermehren kann (Golovliov et al., 2003), komplementiert werden. Das *iglC*-Gen des Stammes *Fth* LVS wurde hierfür in den Vektor kloniert. Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, entstanden bei dem Verdau mit NheI/SacI mehr als die erwarteten zwei Banden. Neben dem gewünschten Fragment (~6,4 kb) und dem

ausgeschnittenen Fragment (~1,4 kb) entstanden weitere Banden, die sich durch den Vergleich mit der unverdauten Kontrolle nicht auf einen unvollständigen Verdau zurückführen lassen. Da pFIV1-Val in *E. coli* in drei Formen vorliegt, handelt es sich bei den weiteren Banden wahrscheinlich um die aufgeschnittene episomale Form (~3,1 kb) und den „leeren“ pUC57-Kana-Vektor.

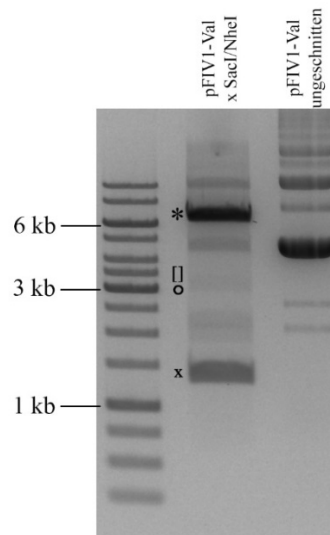


Abbildung 22: Restriktionsverdau von pFIV1-Val mit NheI und SacI. *, gewünschtes Fragment; ◻, episomale Form; ◻, leerer Vektor; x, ausgeschnittenes Fragment. (Tlapák et al., 2018).

Das durch die Klonierung entstandene Plasmid pFIV1-Val+*iglC* wurde erfolgreich in die *ΔiglC*-Mutante integriert, so dass die Komplementante *Fth* LVS *ΔiglC*+FIV-*iglC* entstand. Nach Überprüfung der ortsspezifischen Integration wurden mit diesem Stamm sowie mit dem *Fth* LVS Wildtyp-Stamm (LVS), der *Fth* LVS *ΔiglC*-Mutante (LVS *ΔiglC*) und dem Stamm *Fth* LVS+FIV1-Val (LVS FIV1-Val) Infektionsversuche in der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie U937 wie unter 2.2.8 beschrieben durchgeführt (Abbildung 23). Es zeigte sich, dass sich die *iglC*-Komplementante im Gegensatz zur *ΔiglC*-Mutante intrazellulär vermehrte, auch wenn der Replikationsdefekt der Mutante nicht vollständig komplementiert werden konnte. Zusätzlich ist zu sehen, dass der Integrationsvektor alleine keinen Effekt auf die intrazelluläre Vermehrung hat (Vergleich LVS und LVS FIV1-Val). Durch das parallele Ausplattieren der Stämme *Fth* LVS FIV1-Val und *Fth* LVS *ΔiglC*+FIV-*iglC* auf HCA-Agar mit und ohne Cm wurde zusätzlich überprüft, ob der Vektor während eines Infektionsversuches ohne Selektionsdruck stabil ist. Wie zu sehen ist, unterscheiden sich die CFUs der Stämme auf HCA-Agar mit und ohne Antibiotikum auch nach 72 h nicht (Vergleich durchgehende und gestrichelte Linien).

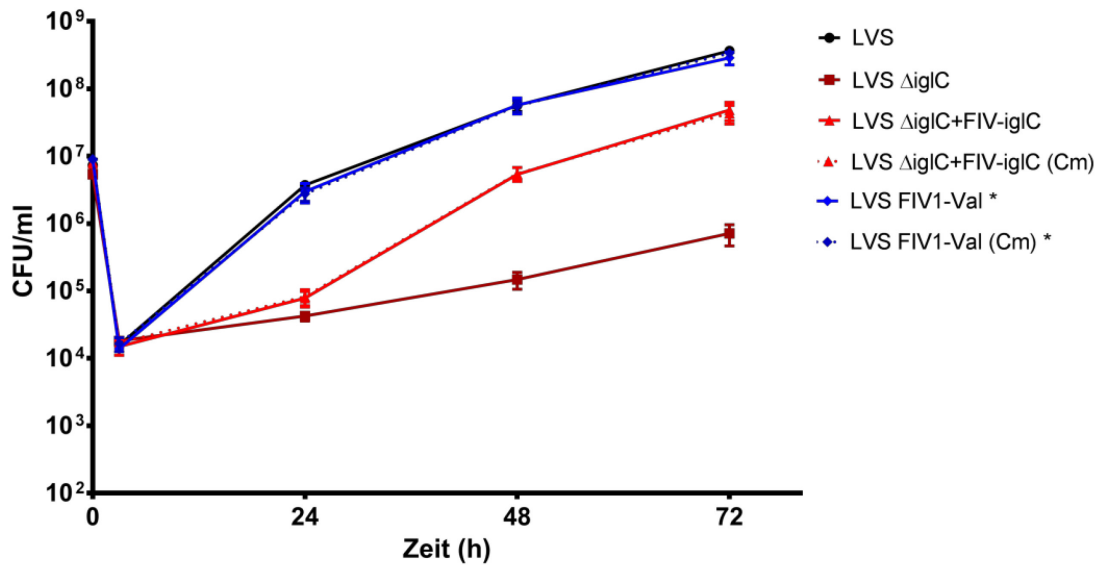


Abbildung 23: Infektionsversuche mit der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie U937. Replikation des *Fth* LVS Wildtyps (LVS), der *Fth* LVS *iglC*-Mutante (LVS Δ iglC), der komplementierten *Fth* LVS *iglC*-Mutante (LVS Δ iglC+FIV-iglC) und dem *Fth* LVS Wildtyp mit FIV1-Val (LVS FIV1-Val). Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert und die CFU alle 24 h durch ausplattieren auf HCA-Agar bestimmt. Die gezeigten Ergebnisse stellen Mittelwerte mit Standardabweichung von Duplikaten dar und sind repräsentativ für mindestens drei unabhängig durchgeführte Versuche. *, nur zwei Mal durchgeführt; Cm, auf HCA+Cm ausplattiert. (Tlapák et al., 2018).

In einem weiteren Infektionsversuch sollte überprüft werden, ob es möglich ist, die Expression des *gfp*-Gens während der intrazellulären Replikation zu beobachten. Die Aktivität des *gfp*-Gens von FIV1-Val während der Infektion von U937 Zellen wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops beobachtet (Abbildung 24). Es ist zu sehen, dass erst nach 48 h U937 Zellen mit fluoreszierenden Francisellen zu erkennen sind und dass die Aktivität des GFP gering ist. Es ist aber auch zu erkennen, dass die Zahl der fluoreszierenden Zellen nach 72 h zunimmt (LVS FIV1-Val). Um das Fluoreszenzsignal zu verstärken wurde ein weiteres *gfp*-Gen in den Vektor kloniert und in den Stamm *Fth* LVS eingebracht. Bei dem resultierenden Stamm *Fth* LVS FIV1-Valgfp konnten bereits nach 24 h U937 Zellen mit fluoreszierenden Francisellen detektiert werden. Insgesamt scheint es mehr fluoreszierende Zellen zu geben, wobei auch hier das Fluoreszenzsignal insgesamt schwach ausfällt (Abbildung 24, LVS FIV1-Valgfp).

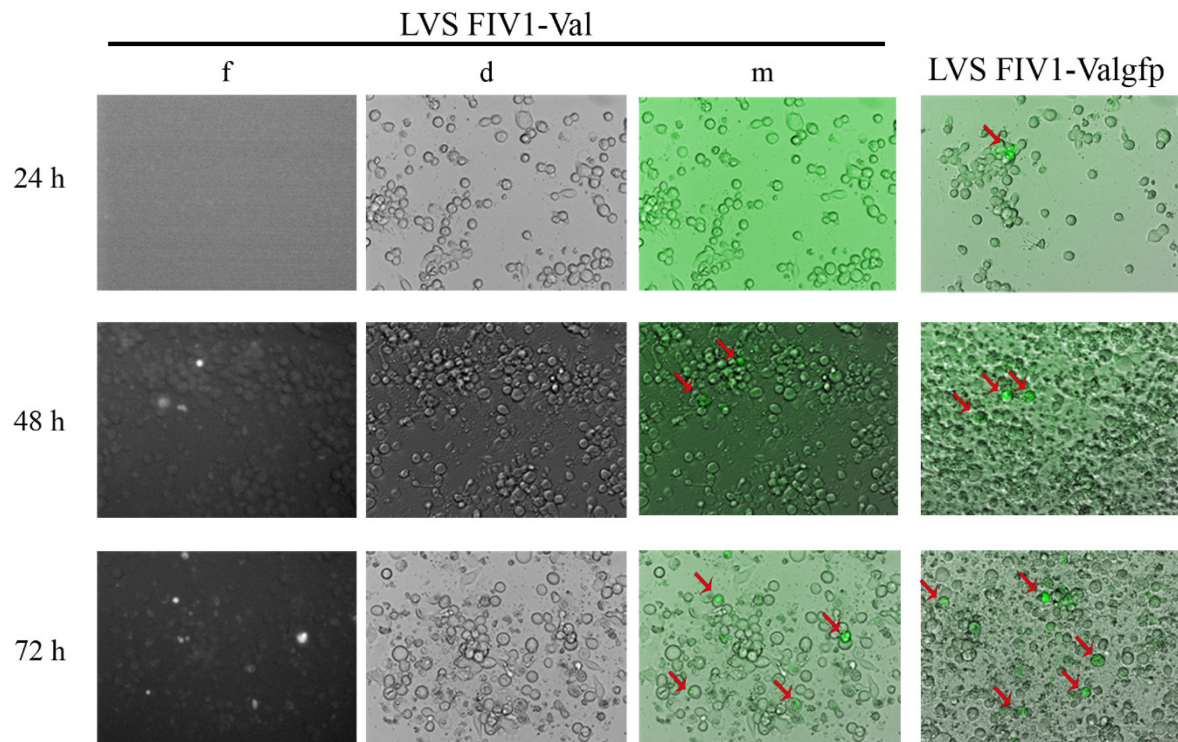


Abbildung 24: Fluoreszenzaufnahmen von U937-Zellen infiziert mit *Fth* LVS FIV1-Val oder *Fth* LVS FIV1-Valgfp. U937 Zellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert und alle 24 h unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Rote Pfeile zeigen fluoreszierende Zellen in übereinandergelegten Bildern. f, Fluoreszenz; d, Durchlicht; m, merge. (Tlapák et al., 2018).

Die Infektionsversuche zeigten, dass pFIV1-Val sich als Integrationsvektor in *Fth* LVS eignet und auch funktional ist.

Um zu überprüfen, ob sich der Vektor auch in anderen *Francisella*-Spezies verwenden lässt und auch dort funktional ist, wurde pFIV1-Val in die Stämme *Fno* U112, *Fno* Fx1 und *Francisella* sp. W12-1067 (Tlapák et al., 2018, nicht in dieser Arbeit) transformiert. Die erfolgreiche Integration von FIV1-Val wurde durch PCR-Analysen bestätigt und die Stämme anschließend für weitere Versuche eingesetzt. Außerdem wurde der Vektor in der Arbeitsgruppe erfolgreich in einen *Fth*-Wildtypstamm (Biberisolat, Schulze et al., 2016) transformiert.

3.2.3 Weiterführende Optimierung pFIV2-Val

Um die Selektion positiver Klone weiter zu vereinfachen, wurde das *sacB*-Gen aus *Bacillus subtilis* in den nicht-integrierenden Teil von pFIV1-Val kloniert. Das Gen kodiert für eine Levansucrase, die in Gegenwart von Sucrose toxisch auf gramnegative Bakterien wirkt

(Steinmetz et al., 1983, 1985). Dadurch sollten Transformanden, die noch den „leeren“ pUC-Kana-Vektor enthalten, nicht mehr auf HCA-Agar mit Sucrose wachsen können und damit negativ selektiert werden. Durch die parallele Zugabe von Cm zum Agar sollte eine gleichzeitige positive Selektion der Klone mit dem integrierten Vektor möglich sein.

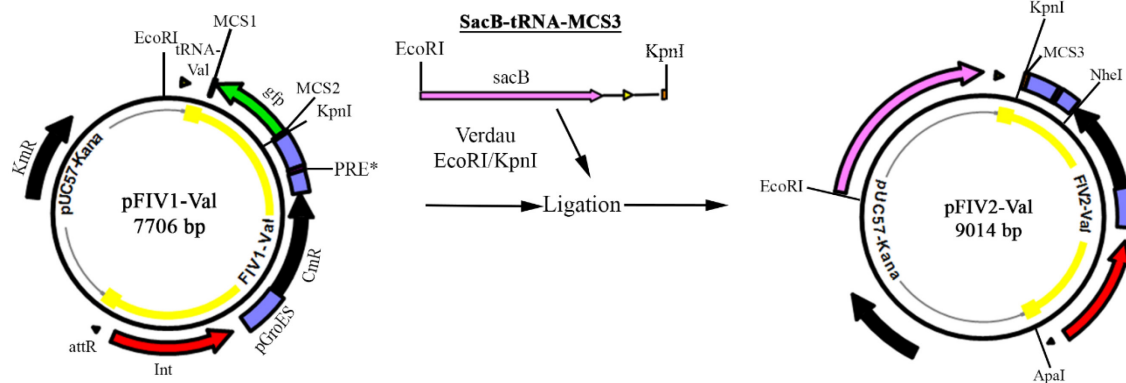


Abbildung 25: Optimierung des FIV-Val Vektors durch Klonierung. Es sind Vektorkarten und das Restriktionsfragment gezeigt, das für die Konstruktion von pFIV2-Val eingesetzt wurde. Antibiotikaresistenzkassetten für Kanamycin (KmR) und Chloramphenicol (CmR) sind in schwarz gezeigt; Dreiecke repräsentieren die tRNA^{Val} und die attR-Stelle; Promotoren sind in blau dargestellt und das Integraseseg in rot; das *gfp*-Gen ist in grün dargestellt. Der FIV-Val-Teil der Vektoren, der in das Genom von *Francisella*-Transformanden integriert, ist durch eine gelbe Linie hervorgehoben. Genutzte Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet (Verändert nach Tlapák et al., 2018).

Im gleichen Klonierungsschritt wurde das *gfp*-Gen von pFIV1-Val entfernt, sowie MCS1 und MCS2 zu der neuen MCS3 mit Restriktionsschnittstellen für AatII, BclI, EcoRV, KpnI, NcoI, NotI und SacI vereint. Durch diesen Klonierungsschritt wurde außerdem die SacII-Schnittstelle, die zur Erzeugung von pFIV1-Val genutzt wurde, entfernt (Abbildung 25).

Der so entstandene Vektor pFIV2-Val (Vektorkarte siehe Anhang, S. 128) wurde in *Fth* LVS elektroporiert und eine Selektion auf HCA-Agar mit 5 % Sucrose durchgeführt. Die erhaltenen Klone wurden auf das Vorhandensein der verschiedenen Formen des Vektors sowie auf den Verlust des „leeren“ pUC57-Kana-Vektors hin untersucht. Abbildung 26 zeigt das Ergebnis der Überprüfung exemplarisch für zehn Klone. Es ist zu sehen, dass für alle Klone sowohl die PCRs für die integrierte Form (1/2** und 3*/4*) als auch die PCR für episomale Form (2**/3*) Produkte der erwarteten Größen um 500 bp nachgewiesen werden konnten. Um überprüfen zu können, ob der Leervektor in den Transformanden noch vorhanden ist, wurde der Primer SacB_R_out kreiert, da das *sacB*-Gen zwischen der Bindungsstelle für den Primer Fha-1^P und der tRNA liegt und damit das PCR-Produkt der Primerkombination

Fha-1^P/Fha-2^{**} für die gewählten PCR-Bedingungen zu groß ist. Bei keinem der Klone ist eine Bande der erwarteten Größe von ca. 600 bp zu erkennen (SacB /4^P) und damit der Leervektor nicht mehr nachweisbar. Bei den beobachteten Banden handelt es sich entweder um die Wolke der ungenutzten Primer (Bande ganz unten) oder unspezifische Produkte (Bande bei ca. 1000 bp). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die kombinierte positive Selektion durch Cm mit der gleichzeitigen negativen Selektion durch Sucrose erfolgreich ist, da nur Cm-resistente Transformanden gefunden wurden, die den Leervektor verloren haben.

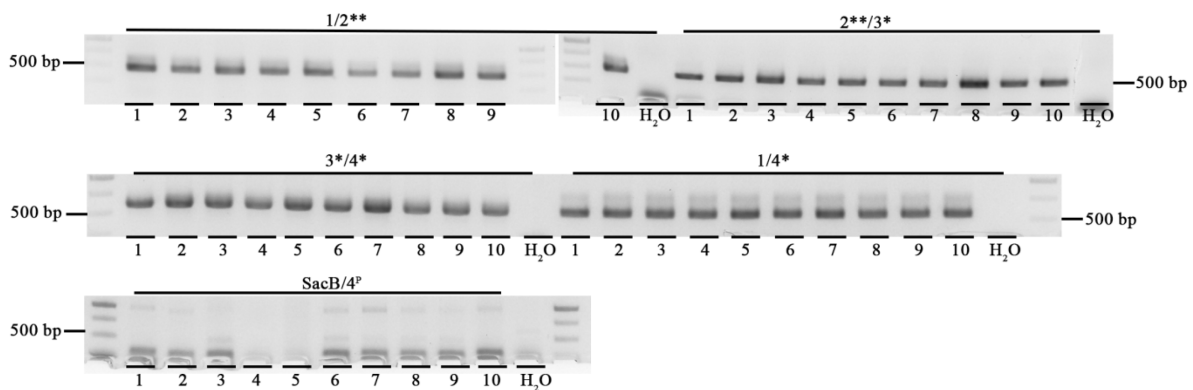


Abbildung 26: PCR-Analyse von Transformanden des Stammes *Fth* LVS mit pFIV2-Val. Primerpaare 1/2^{**} (Fha-1/Fha-2^{**}; Produkt: ca. 450 bp) und 3*/4* (Fha-3*/Fha-4*; Produkt: ca. 580 bp) zeigen die chromosomal integrierte Form, Primer 2^{**}/3* (Fha-2^{**}/Fha-3*; Produkt: ca. 480 bp) zeigen die episomale Form und Primer 1/4* (Fha-1/Fha-4*; Produkt: ca. 550 bp) die chromosomale *attB*-Stelle. Die Primer SacB/M13R (SacB_R_out/Fha-4^P; Produkt: ca. 600 bp) weisen den „leeren“ pUC57-Kana-Vektor nach.

3.2.4 Stabilität und Kopienzahl

Neben der Übertragbarkeit auf verschiedene Spezies ist eine weitere wichtige Eigenschaft eines Integrationsvektors dessen Stabilität ohne Selektionsdruck. Um die Stabilität der FIV-Val-Vektoren in den verschiedenen *Francisella*-Spezies zu überprüfen, wurden die Stämme wie unter 2.2.7 10 Mal in MediumT ohne Antibiotika passagiert und anschließend die CFU auf HCA-Agar mit und ohne Cm bestimmt. Außerdem wurden Aliquots der Kulturen für die DNA-Isolation und für Western Blot-Analysen genutzt.

Wie in Abbildung 27 A zu sehen ist, unterscheidet sich die CFU der Stämme auf Agar mit und ohne Antibiotikum nicht. Dies zeigt, dass die Vektoren stabil in den *Francisellen* verbleiben. Zusätzlich zu der CFU wurde auch die Integration der Vektoren mittels PCR überprüft. In Abbildung 27 B ist zu sehen, dass auch nach 10-maligem Überimpfen der Stämme ohne Selektionsdruck noch sowohl die integrierte Form (1/2^{**} und 3*/4*) als auch die episomale

Form (2**/3*) der Vektoren vorhanden sind. Auch das *gfp*-Gen konnte in den Stämmen mit FIV1-Val nachgewiesen werden, während im Stamm *Fth* LVS FIV2-Val, in dem kein *gfp*-Gen vorhanden ist, kein Produkt detektiert werden konnte.

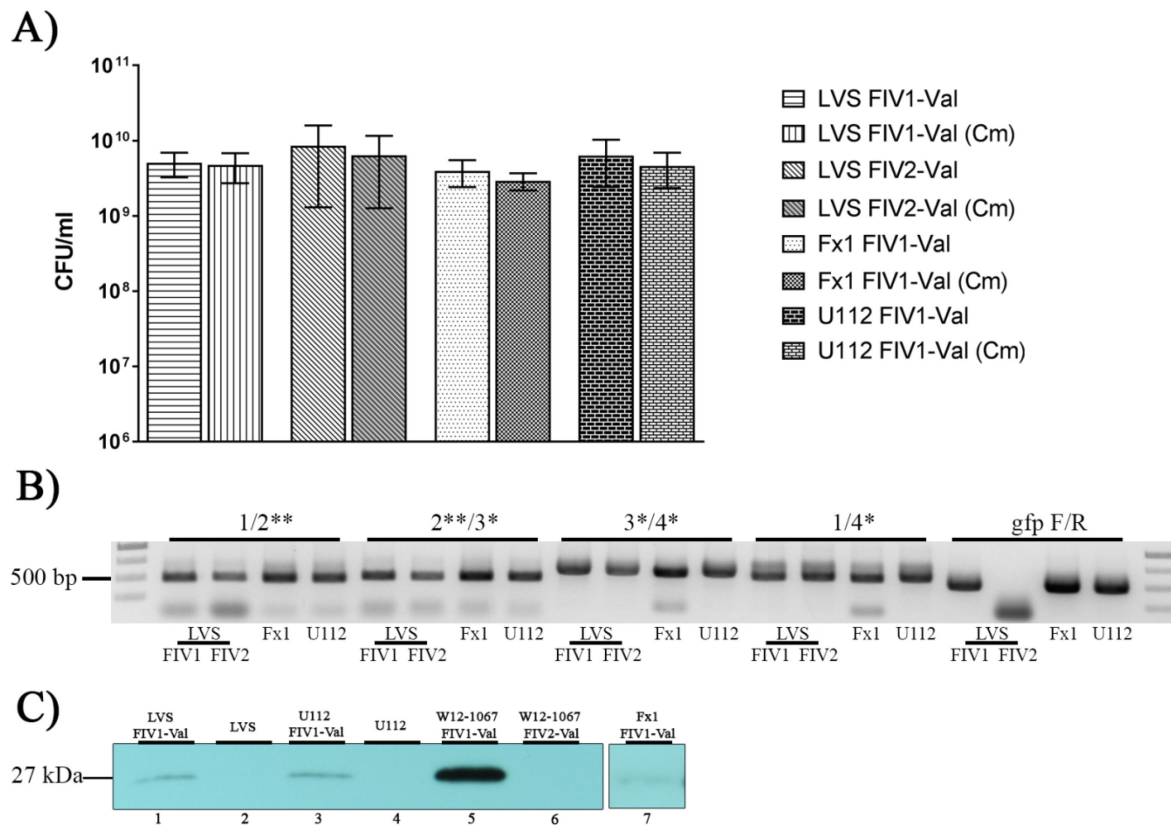


Abbildung 27: Stabilität der FhaGI-1 basierten Vektoren. Die Stämme *Fth* LVS FIV1-Val, *Fth* LVS FIV2-Val; *Fno* U112 FIV1-Val und *Fno* Fx1 FIV1-Val wurden 10 Mal in MediumT ohne Antibiotika passagiert. A) CFU der Stämme auf HCA-Agar und HCA-Agar mit Chloramphenicol nach 10 Passagen in MediumT ohne Antibiotikum. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen. B) PCR-Analyse genomischer DNA verschiedener Stämme nach 10 Passagen ohne Antibiotikum. Mit den Primern 2/3 (Fha-2**/Fha-3*; Produkt: ca. 480 bp) wird die episomale Form nachgewiesen, mit den Primerpaaren 1/2 und 3/4 (Fha-1/Fha-2**; Produkt: ca. 450 bp und Fha-3*/Fha-4*; Produkt: ca. 580 bp) die chromosomal integrierte Form und mit dem Primerpaar 1/4 (Fha-1/Fha-4*; Produkt: ca. 550 bp) die chromosomale *attB*-Stelle. Das *gfp*-Gen wird mit dem Primerpaar *gfp*F/R (Produktgröße ca. 500 bp) nachgewiesen C) Western Blot-Analyse von Ganzzelllysaten mit einem α -GFP-Antikörper. (Verändert nach Tlapák et al., 2018).

Die Aktivität des *gfp*-Gens wurde außerdem mittels Western Blot untersucht. Es ist zu sehen, dass GFP in den Stämmen *Fth* LVS, *Fno* U112 und *Fno* Fx1 mit FIV1-Val nur sehr schwach exprimiert wird (Abbildung 27 C, Spuren 1, 3 und 7). Die mitgeführten Proben der Stämme ohne FIV-Vektoren zeigen, dass die beobachteten Signale keine Kreuzreaktionen mit den

Wildtyp-Stämmen darstellen, sondern spezifisch für das GFP sind (Spuren 2 und 4). Im Stamm *Francisella* sp. W12-1067 ist die detektierte Menge an GFP deutlich höher als in den anderen Stämmen, wobei auch hier in der mitgeführten Kontrolle kein GFP-Signal zu detektieren ist (Spuren 5 und 6).

Tabelle 14: In der qPCR gemessene Ct-Werte und Berechnung der Kopienzahl von FIV1 und FIV2.

Vektor (ng)	Ct ₁	Ct ₂	Mittelwert Ct	Δ Ct	Kopien	Mittelwert Kopien
FIV1 (0,1)						
fopA	23,637	23,584	23,610	-1,915	3,772	3,526
CmR	21,636	21,754	21,695			
FIV1 (0,01)						
fopA	27,016	27,004	27,010	-1,617	3,068	
CmR	25,380	25,405	25,393			
FIV1 (0,001)						
fopA	30,613	30,673	30,643	-1,902	3,739	
CmR	28,745	28,735	28,740			
FIV2 (0,1)						
fopA	23,525	23,372	23,448	-1,817	3,524	3,571
CmR	21,631	21,631	21,631			
FIV2 (0,01)						
fopA	26,971	26,952	26,961	-1,837	3,575	
CmR	24,964	25,283	25,123			
FIV2 (0,001)						
fopA	30,601	30,341	30,471	-1,853	3,614	
CmR	28,592	28,642	28,617			

Eine weitere wichtige Eigenschaft eines Vektors ist dessen Kopienzahl. Um diese für die FIV-Val-Vektoren zu bestimmen, wurde die Real-Time-PCR eingesetzt. Als Vergleichs-gen wurde dabei das Gen *fopA* genutzt, welches in nur einfacher Kopie im Genom des Stammes

Fth LVS vorkommt. Für die Vektoren wurde die CmR als Zielgen für die Primer ausgewählt. Zur Berechnung der Kopienzahl der FIV-Vektoren wurde chromosomale DNA der Stämme *Fth* LVS FIV1-Val und *Fth* LVS FIV2-Val in drei Verdünnungen (0,1; 0,01 und 0,001 ng) verwendet und jeweils Doppelwerte bestimmt. In Tabelle 14 sind die gemessenen Ct-Werte der verschiedenen Verdünnungsstufen sowie die wie unter 2.2.4.14 beschrieben berechneten Kopienzahlen aufgeführt. Hierbei wurden für die Vektorvarianten FIV1-Val und FIV2-Val Kopienzahlen von 3-4 Kopien (Mittelwerte der Verdünnungen 3,5 Kopien bzw. 3,6 Kopien) festgestellt.

3.2.5 pFIV3-Val

Die Untersuchungen zur Kopienzahl der Vektoren haben gezeigt, dass bei beiden Vektorvarianten ungefähr 3-4 Kopien vorliegen. Da sowohl bei FIV1-Val als auch bei FIV2-Val die ortsspezifische Integrase noch vorhanden ist, kommt es in den Transformanden zur Ausbildung der episomalen Form. Da dies unter Umständen für die beobachtete Erhöhung der Kopienzahl der Vektoren verantwortlich ist, wurde zur weiteren Verbesserung das Integrase-Gen auf den nicht-integrierenden Teil des Vektors verschoben, wodurch dieses bei der Selektion auf Sucroseplatten zusammen mit dem pUC57-Kana-Teil des Vektors verloren gehen sollte.

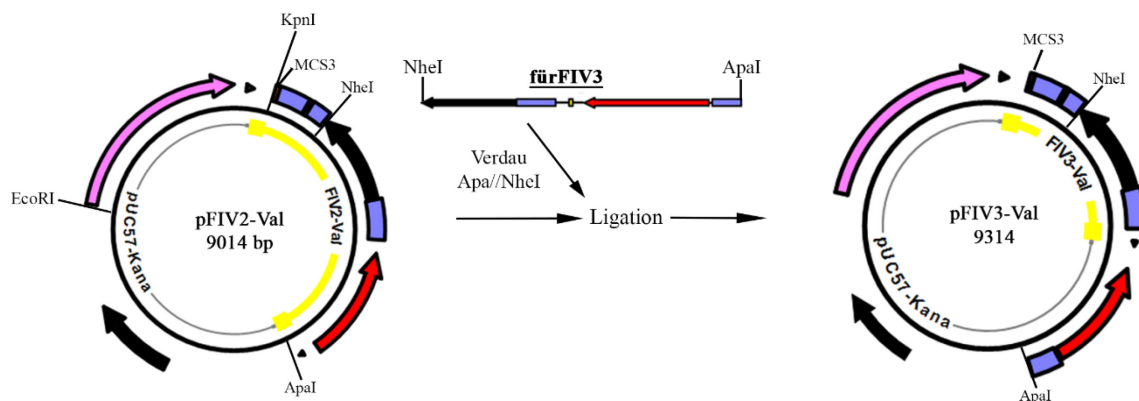


Abbildung 28: Erzeugung von pFIV3-Val. Es sind Vektorkarten und das Restriktionsfragment gezeigt, das für die Konstruktion von pFIV3-Val eingesetzt wurde. Antibiotikaresistenzkassetten für Kanamycin (KmR) und Chloramphenicol (CmR) sind in schwarz gezeigt; Dreiecke repräsentieren die tRNA^{Val} und die attR-Stelle; Promotoren sind in blau dargestellt und das Integrasegen in rot. Der FIV-Val-Teil des Vektors, der in das Genom von *Francisella*-Transformanden integriert, ist durch eine gelbe Linie hervorgehoben. Genutzte Restriktionsstellen sind eingezeichnet.

Hierfür wurde das Konstrukt für FIV3 mit NheI und ApaI in den Vektor pFIV2-Val kloniert (Abbildung 28). Dieser Schritt wurde durchgeführt, obwohl nicht klar war, welche Auswirkungen die veränderte Lokalisation der Integrase in Bezug auf die tRNA und die *attR*-Stelle auf die Funktionalität des Vektors haben würde. Um sicherzugehen, dass die Integrase vor der Selektion auf Agarplatten in ausreichendem Maß synthetisiert wird, wurde ein zusätzlicher GroEL-Promotor vor das Integrasegen gesetzt. Da die Integrase nicht mehr auf dem integrierenden Teil des Vektors liegt, mussten für den Nachweis der verschiedenen Formen der neuen Vektorvariante pFIV3-Val (Vektorkarte siehe Anhang S. 129) neue Primer kreiert werden. Der Primer Fha-3* wurde durch den Primer Fha-3Cm und der der Primer Fha-4^P durch den Primer Fha-4Int ersetzt.

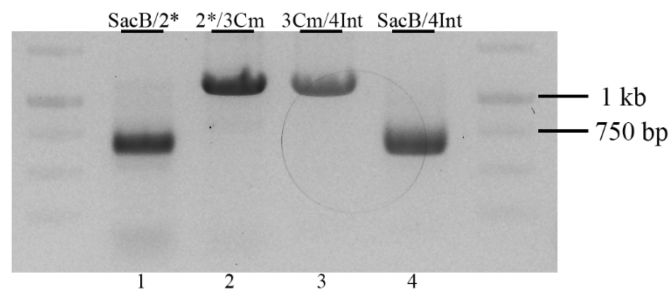


Abbildung 29: PCR-Analyse eines Transformanden von pFIV3-Val. PCR-Analyse eines *E. coli*-Transformanden. Primer 2**/3Cm (Fha-2**/Fha-3Cm; Produkt: ca. 1000 bp) zeigen die episomale Form und Primer SacB/4Int (SacB_R_out/Fha-4Int; Produkt: ca. 740 bp) die „leere“ chromosomale *attB*-Stelle. Die integrierte Form des Vektors wird durch die Primerpaare SacB/2** (SacB_R_out/Fha-2**; Produkt: ca. 640 bp) und 3Cm/4Int (Fha-3Cm/Fha-4Int; Produkt: ca. 1100 bp) nachgewiesen.

In *E. coli* konnten durch PCR alle Formen der dritten Vektorvariante nachgewiesen werden (Abbildung 29). Dies zeigt, dass trotz der veränderten Position der Integrase auch die neue Vektorvariante im rekombinanten System funktional ist.

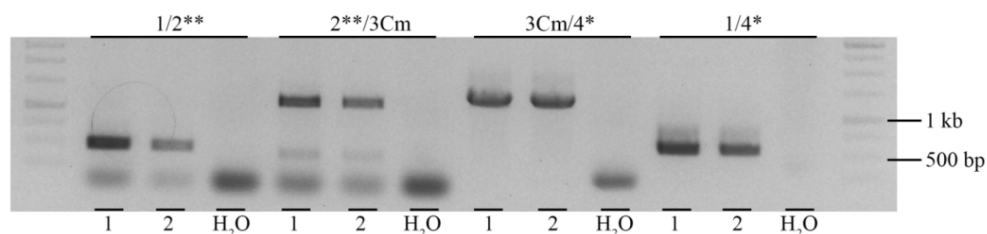


Abbildung 30: PCR-Analyse von Transformanden des Stammes *Fth* LVS mit FIV3-Val. Primerpaare 1/2** (Fha-1/Fha-2**; Produkt: ca. 450 bp) und 3Cm/4* (Fha-3Cm/Fha-4*; Produkt: ca. 970 bp) zeigen die chromosomal integrierte Form, Primer 2**/3Cm (Fha-2**/Fha-3Cm; Produkt: ca. 1000 bp) zeigen die episomale Form und Primer 1/4* (Fha-1/Fha-4*; Produkt: ca. 550 bp) die chromosomale *attB*-Stelle.

Nach Elektroporation in den Stamm *Fth* LVS wurden die Transformanden überprüft. Hierbei zeigte sich, dass zwar die integrierte Form nachweisbar war (Abbildung 30, 1/2** und 3Cm/4Int), jedoch auch immer noch die episomale Form (Abbildung 30, 2**/3Cm). Da diese ohne die Integrase nicht mehr entstehen sollte, wurden zwei der erhaltenen Klone weitergehend daraufhin untersucht, ob der pUC57-Kana-Vektor tatsächlich verloren wurde. Als zusätzliche Kontrolle wurde genomische DNA des *Fth* LVS Wildtyps mitgeführt, um Kreuzreaktionen der Primer auszuschließen. Wie in Abbildung 31 zu sehen ist, konnte mit den Primern SacB_R_out/Fha-2** kein Produkt der erwarteten Größe von ca. 600 bp nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass FIV3-Val am 3'-Ende nicht mehr in das Vektorrückgrat integriert vorliegt. Die Überprüfung mit den Primern Fha-3Cm/Fha-4Int ergab jedoch ein Produkt von 1100 bp. Dies entspricht exakt der erwarteten Größe, wenn FIV3-Val auf der 3'-Seite noch in den pUC57-Kana-Vektor integriert vorliegt. Die PCR mit den Primern SacB_R_out/Fha-4Int führte hingegen zu keinem eindeutigen Ergebnis.

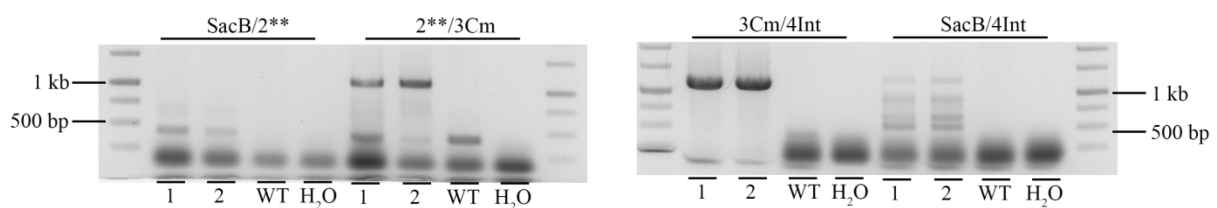


Abbildung 31: PCR-Analyse zweier Klone des Stammes *Fth* LVS mit FIV3-Val sowie des Wildtyps. Primer SacB/2** (SacB_R_out/Fha-2**; Produkt: ca. 640 bp) und 3Cm/4Int (Fha-3Cm/Fha-4Int; Produkt: ca. 1100 bp) zeigen die in den Vektor integrierte Form, Primer 2**/3Cm (Fha-2**/Fha-3Cm; Produkt: ca. 1000 bp) die episomale Form und Primer SacB/4Int (SacB_R_out/Fha-4Int; Produkt: ca. 740 bp) den „leeren pUC57-Kana Vektor. WT, Wildtyp.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Integrasesegen nicht mit dem pUC57-Kana-Vektor verloren gegangen sondern teilweise noch vorhanden ist. Da ein Vorhandensein der Integrase die Bildung der episomalen Form erklären könnte, wurden Untersuchungen mit weiteren Primerkombinationen durchgeführt (Abbildung 32). Mit den Primern Fha-Int_U und Fha-Int_R konnte das gesamte Integrasesegen nachgewiesen werden und mit der Primerkombination Fha-3*/Fha-4^P der Übergang aus dem Integrasesegen in den pUC57-Kana-Vektor.

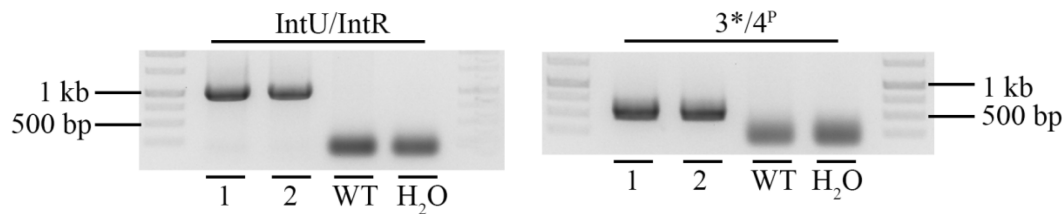


Abbildung 32: PCR-Analyse zweier Klone des Stammes *Fth* LVS mit FIV3-Val zum Nachweis des Integrasegens. Primer IntU1/IntR (Fha-Int_U/Fha-Int_R, Produkt: ca. 910 bp) weisen das Integrasegen nach und Primer 3*/4^P (Fha-3*/Fha-4^P; Produkt: ca. 450 bp) den Übergang vom Integrasegen zum pUC57-Kana-Vektor. WT, Wildtyp.

Diese Ergebnisse zeigen, dass neben der integrierten Form von FIV3-Val auch das Integrasegen mit Teilen des pUC57-Kana-Vektors noch vorliegt, wobei das *sacB*-Gen nicht mehr nachgewiesen werden konnte und anscheinend durch die Selektion auf Sucroseplatten verloren gegangen ist. Die Klone zeigten zudem auf HCA+Km kein Wachstum, was bedeutet, dass auch der Teil des pUC-Kana-Vektors mit der KmR nicht mehr vorhanden ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Version von pFIV3-Val erzeugt werden, bei der das Integrasegen nicht mehr in den *Francisella*-Transformanden vorliegt. Auf Grund der präsentierten Ergebnisse wurde pFIV3-Val nicht für weitere Untersuchungen eingesetzt.

3.3 Ist FhaGI-1 ein funktionaler Bakteriophage

Da der Stamm *Fhis* AS02-814 nicht für Untersuchungen zur Verfügung steht, sollte die gesamte Genominsel FhaGI-1 und damit der putative Phage synthetisch hergestellt werden. Unsere Untersuchungen sollten erstmals zeigen, ob FhaGI-1 tatsächlich für einen funktionalen Phagen kodiert. Aus diesem Grund wurde die Sequenz der Genominsel auf zwei Hälften aufgeteilt, um zu vermeiden, dass bei der Firma ein funktionaler Phage entsteht. Die beiden Hälften sollten dann zusammengeführt und in einen *Francisella*-Stamm eingebracht werden. Die Aufteilung des putativen Phagen ist in Abbildung 33 dargestellt. Die erste Hälfte, genannt Fhis3523-GI-1, umfasst dabei die tRNA^{Val} sowie die Gene FN3523_0986 bis FN3523_1010, die hauptsächlich für Proteine kodieren, die am Phagenaufbau beteiligt sind. Um die späteren Untersuchungen sowie die Selektion zu erleichtern, wurde zusätzlich die Sequenz eines *gfp*-Gens integriert.

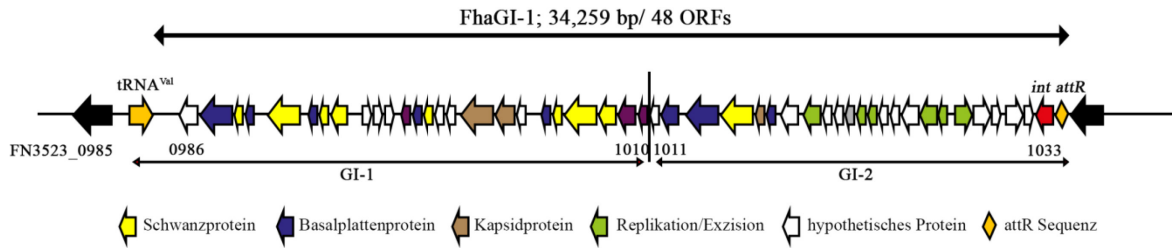


Abbildung 33: Aufteilung der Sequenz von FhaGI-1 für die synthetische Herstellung. FhaGI-1 wurde für die synthetische Herstellung in zwei Hälften geteilt. Die erste Hälfte, Fhis3523-GI-1 (GI-1), umfasst die $tRNA^{Val}$, sowie die Gene FN3523_0986 bis FN3523_1010, die für Gene kodieren, die am Phagenaufbau beteiligt sind. Die zweite Hälfte, Fhis3523-GI-2 (GI-2), enthält die Gene FN3523_1011 bis FN3523_1033, die hauptsächlich für regulatorische Proteine kodieren, und die *attR*-Stelle.

Die zweite Hälfte, genannt Fhis3523-GI-2, enthält die Gene FN3523_1011 bis FN3523_1033, die hauptsächlich für regulatorische Proteine kodieren, sowie die Sequenz von Repeat-1 (*attR*). Eine KmR wurde ebenfalls integriert, um die Selektion positiver Klone zu erleichtern. Die erste Hälfte des Phagen wurde erfolgreich synthetisiert, Fhis3523-GI-2 wurde jedoch in vier einzelnen Teilen geliefert und musste im Rahmen dieser Arbeit hergestellt werden.

3.3.1 Klonierung der zweiten Hälfte von FhaGI-1

Die einzelnen Fragmente von Fhis3523-GI-2, im Folgenden mit F1-F4 bezeichnet, lagen in verschiedenen Vektoren vor und variierten in ihrer Größe zwischen 1,8 kb (F3) und ca. 6,3 kb (F2).

Abbildung 34 zeigt eine schematische Darstellung der überlegten Klonierungsstrategie. Die Fragmentgrößen sowie die Vektoren, in denen die Fragmente vorlagen, sind in Klammern angegeben. Um die verschiedenen Fragmente zusammenbringen zu können, musste zunächst F4 in den Vektor pBCSK+ umklont werden, um so zusätzliche Restriktionsschnittstellen zu erhalten, die das weitere Klonieren ermöglichen sollten (Abbildung 34, Schritt 1). Das so erhaltene Fragment F4B wurde im zweiten Schritt zusammen mit F3 in den aufgeschnittenen pUC57-Vektor mit F2 kloniert (Abbildung 34, Schritt 2).

Eine sequentielle Klonierung der einzelnen Fragmente war auf Grund der zur Verfügung stehenden Restriktionsschnittstellen nicht möglich, sodass alle drei Fragmente in einem

einzigsten Schritt ligiert wurden. Da innerhalb der drei zu ligierenden Fragmente keine Antibiotikaresistenzkassette vorlag, konnte außer der im pUC57-Vektor kodierten Ampicillinresistenz kein zusätzlicher Selektionsdruck auf die *E. coli*-Transformanden ausgeübt werden, was zu einer Vielzahl an zu testenden Klonen führte.

Für eine initiale Überprüfung wurden die Primer Phage_KO_1U und Phage_KO_2R kreiert, die in den Fragmenten F2 und F4B binden, wodurch das PCR-Produkt das gesamte Fragment F3 überspannt, was zu einer erwarteten Produktgröße von ca. 2,5 kb führt. Die Untersuchung der erhaltenen *E. coli*-Transformanden führte schließlich zur Identifizierung zweier Klone, die eine Bande der erwarteten Größe aufwiesen (Abbildung 35 A, Spuren 3 und 4).

Um sicherzustellen, dass das Fragment F3 tatsächlich in der richtigen Orientierung eingebaut wurde, wurde Plasmid-DNA der Klone 3 und 4 zusätzlich mit den Primern Phage_F2_out_U und Phage_F3_out_R überprüft. Wie in Abbildung 35 B zu sehen ist, konnte für beide Klone eine Bande auf der erwarteten Höhe von ca. 530 bp und damit die erfolgreiche Klonierung des Fragmentes F5 nachgewiesen werden.

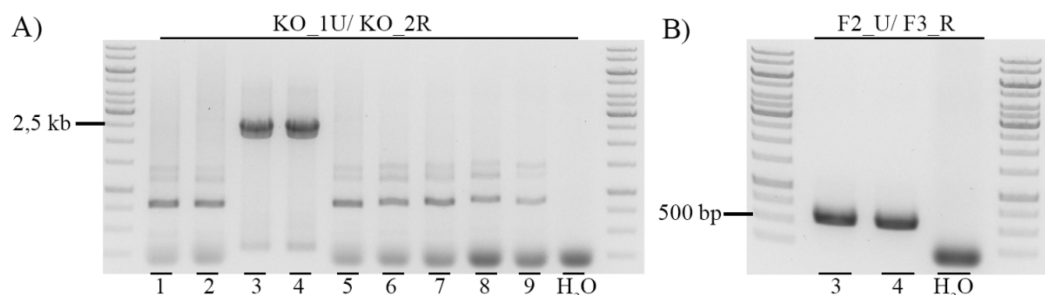


Abbildung 35: PCR Analyse von *E. coli*-Klonen nach der Transformation mit dem Ligationsprodukt der Fragmente F2, F3 und F4B. A) Analyse mit den Primern Phage_KO_1U und Phage_KO_2R, die das Fragment F3 überspannen, erwartete Produktgröße: 2,5 kb. B) Überprüfung der Klone 3 und 4 auf die richtige Orientierung des Fragmentes F3 mit den Primern Phage_F2_out_U (F2_U) und Phage_F3_out_R (F3_R), erwartete Produktgröße: 530 bp.

In Schritt 3 der Klonierung wurde das Fragment F1 in das neu entstandene Fragment F5 kloniert. Da F1 eine Kanamycinresistenzkassette enthält, konnte nach der Transformation eine Selektion auf Kanamycin-resistente Klone durchgeführt werden. Die so erhaltenen Klone wurden mittels PCR auf die erfolgreiche Integration von F1 überprüft. Hierfür wurden die Primerpaare M13U/Phage_Ko_Km_R und Phage_F1_out_U/Phage_F2_out_R verwendet. Als Negativkontrolle wurde Plasmidpräparation des Fragments F5 verwendet. In Abbildung 36 ist das Ergebnis dieser Überprüfung exemplarisch für sieben der erhaltenen Klone gezeigt.

Es ist zu sehen, dass während alle getesteten Klone bei der Überprüfung mit den Primern M13U/Phage_KO_Km_R eine Bande der erwarteten Größe von ca. 730 bp zeigten (A), lediglich ein Klon auch eine Bande der erwarteten Größe von ca. 550 bp bei der Überprüfung mit den Primern F1_out_U/ F2_out_R aufwies (B, Spur 7). Damit konnte für diesen Klon die erfolgreiche Klonierung von Fhis3523-GI-2 nachgewiesen werden.

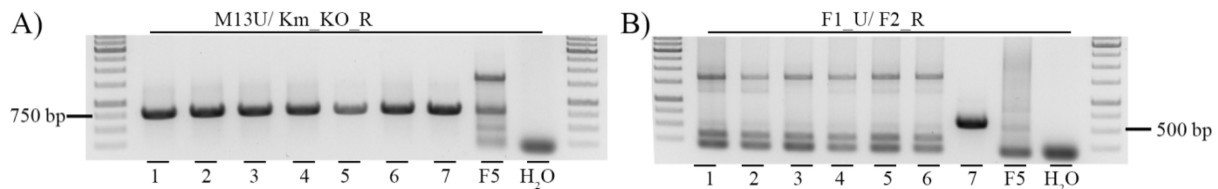


Abbildung 36: PCR-Analyse von *E. coli*-Klonen nach der Transformation mit dem Ligationsprodukt der Fragmente F5 und F1. A) Analyse von sieben Klonen mit den Primern M13U und Phage_Km_KO_R, erwartete Produktgröße: 730 bp. B) Überprüfung von 7 Klonen mit den Primern F1_out_U (F1_U) und F2_out_R (F2_R), erwartete Produktgröße: 550 bp.

3.3.2 Zusammenführen von GI-1 und GI-2

Die beiden nun vollständig vorliegenden Hälften des Phagen sollten in einem finalen Schritt zusammengeführt und damit FhaGI-1 komplettiert werden. Für das Zusammenführen der beiden ca. 18,5 kb großen Hälften wurden beide aus ihrem Vektorrückgrat ausgeschnitten und nach der Auftrennung der Fragmente in einem Agarosegel mittels Phenol-Kälte-Extraktion wie unter 2.2.4.7.2 beschrieben aufgereinigt und anschließend ligiert. Das Ligationsprodukt wurde direkt in den Stamm *Fth* LVS elektroporiert (Abbildung 34, Schritt 4a). Dieses Vorgehen wurde gewählt, da die Vermutung bestand, dass die GI nach erfolgreicher Ligation und Transformation in den Transformanten die episomale Form bilden und sich anschließend in das Genom der Transformanten integrieren und dort stabil verbleiben würde. Die Selektion auf HCA+Km führte jedoch nicht zu Transformanten.

Da die zuvor genannte Strategie nicht erfolgreich war, wurde ein alternativer Klonierungsweg konzipiert, bei dem nicht beide Hälften aus ihrem Vektorrückgrat ausgeschnitten werden, sondern Fhis3523-GI-2 in das mit NotI aufgeschnittene Plasmid pFhis3523-GI-1 kloniert wird. Um bei der Selektion von *E. coli* Transformanten mit dem Ligationsprodukt der beiden Teile einen doppelten Selektionsdruck ausüben zu können, wurde zunächst eine CmR in pFhis3523-GI-1 kloniert. Hierfür wurde die CmR von pFIV2-Val mit den Primern GI-1U Cm_neu und GI-1 R Cm mittels PCR amplifiziert. Für die PCR wurde eine Polymerase ausgewählt, die bei der Amplifikation keine A-Überhänge erzeugt, um das

Fragment anschließend blunt-end in die mit *Sma*I aufgeschnittene *KmR* des pET-28-Vektorrückgrades von pFhis3523-GI-1 klonieren zu können. Das Ligationsprodukt wurde in *E. coli* transformiert, auf LB+Cm selektiert und die erhaltenen Klone mittels Aufkoch-PCR überprüft. Da bei der blunt-end Klonierung nicht vorherzusagen ist, in welcher Orientierung das Fragment in den Vektor integriert, wurden für die Überprüfung zwei Primerkombinationen genutzt. Sowohl mit der Kombination GI-1U Cm_neu/gfp_out_U als auch mit der Kombination gfp_out_U/GI-1R Cm sollte ein Produkt von ca. 3 kb entstehen. Wie in Abbildung 37 zu sehen ist, konnte für die vier überprüften Klone die CmR nachgewiesen werden (Spuren 1-4), während in den Negativkontrollen des ursprünglichen pFhis3523-GI-1 (GI-1), sowie bei pFIV2-Val (FIV) kein Produkt der richtigen Größe erhalten wurde.

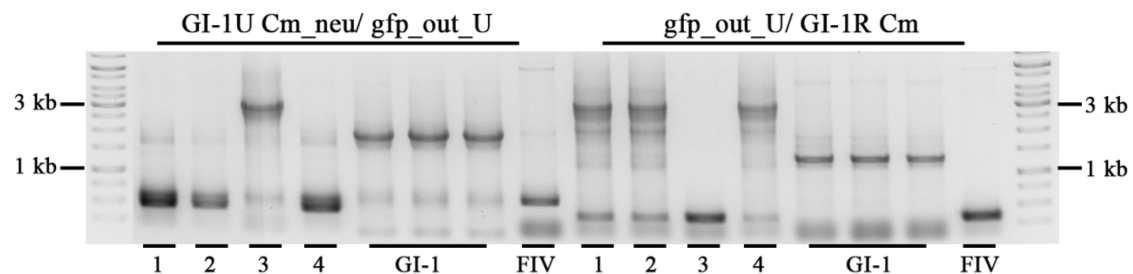


Abbildung 37: Überprüfung von der Integration der CmR in pFhis3523-GI-1. Die Primerkombinationen GI-1U Cm_neu/ gfp_out_U und gfp_out_U/GI-1R Cm weisen die Integration der CmR in den beiden möglichen Orientierungen nach; erwartete Produktgröße: ca. 3000 bp. GI-1, pFhis3523-GI-1; FIV, pFIV2-Val.

Nachdem dieser Klonierungsschritt erfolgreich war, sollte das so entstandene pFhis3523-GI-1Cm mit Fhis3523-GI-2 zusammengeführt werden (Abbildung 34, 4b). Hierfür wurden beide Teile mit *Not*I verdaut, pFhis3523-GI-1Cm dephosphoryliert und anschließend beide Stücke ligiert. Das Ligationsprodukt wurde aufgeteilt und sowohl in *E. coli* als auch in Francisellen elektroporiert. Bei den Francisellen wurde der Stamm *Francisella* sp. W12-1067 für die Versuche ausgewählt, da Versuche in der Arbeitsgruppe gezeigt hatten, dass dieser Umweltstamm die FIV-Vektoren gut aufnimmt und im Vergleich zum Stamm *Fth* LVS eine stärkere Expression des Reportergens aufweist (siehe Abbildung 27 C, Vergleich Spuren 1 und 5).

Während nach der Transformation von *E. coli* keine Klone zu finden waren, führte die Transformation von *Francisella* sp. W12-1067 zu zahlreichen Klonen. Diese wurden mittels Aufkoch-PCR auf das Vorhandensein der beiden Konstrukthälften untersucht. Abbildung 38

zeigt das Ergebnis exemplarisch für neun der Überprüften Klone. Bei keinem der getesteten Klone ergab die Überprüfung mit den Primern Phage F/ Phage R, die in den Genen FN3523_1005 und FN3523_1007 binden und damit das Vorhandensein von Fhis3523-GI-1Cm nachweisen, ein Produkt der erwarteten Größe von ca. 2 kb.

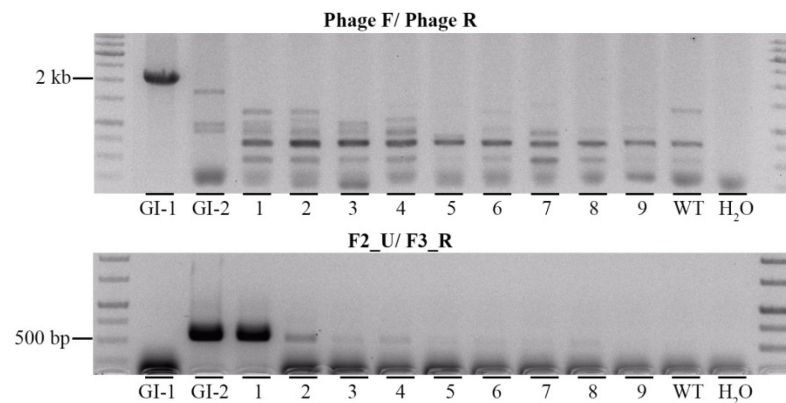


Abbildung 38: Überprüfung von Transformanten des Stammes *Francisella* sp. W12-1067 auf das Vorhandensein der Hälften von FhaGI-1. Die Primer Phage F/Phage R, die in den Genen FN3523_1005 und FN3523_1007 binden, weisen die Existenz von Fhis3523-GI_1 nach (Produkt: ca. 2000 bp). Das Vorhandensein von Fhis3523-GI-2 wurde mit den Primern Phage_F2_out_U (F2_U) und Phage_F3_out_R (F3_R) überprüft (Produkt: ca. 530 bp). GI-1, pFhis3523-GI-1Cm; GI-2, pFhis3523-GI-2; WT, Wildtyp.

Bei der Überprüfung mit dem in Fhis3523-GI-2 bindenden Primerpaar Phage_F2_out_U/Phage_F3_out_R (F2_U/F3_R) konnte für Klon 1 eine Bande derselben Intensität wie bei der Positivkontrolle (GI-2) nachgewiesen werden. Auch bei den Klonen 2-8 ist eine Bande bei der erwarteten Größe von 530 bp zu erkennen, auch wenn diese deutlich schwächer ausfällt als bei Klon 1.

Da auf Fhis3523-GI-2 sowohl die *attR*-Stelle als auch das Integrasegen vorhanden sind, besteht die Möglichkeit, dass Fhis3523-GI-2 bei der Ligationsreaktion religiert hat und damit in einer Ringform vorliegt, die in das Genom integrieren kann. Um dies zu überprüfen sollten die Klone 1-5 genauer untersucht werden. Bei der Anzucht der Klone wuchs Klon 2 jedoch nicht mehr an, so dass dieser in den weiteren Analysen nicht mehr berücksichtigt werden konnte.

Eine erneute Überprüfung mit den Primern F2_out_U/F3_out_R bestätigte das Ergebnis der vorangegangenen PCR bezüglich des Vorhandenseins von Fhis3523-GI-2 in den untersuchten Klonen (Abbildung 39, F2_U/F3_R). Durch die stammspezifischen Primer Fha-1^{W12}/Fha-4^{W12}

konnte das intakte tRNA^{Val}-Gen in allen Klonen und dem Wildtyp durch eine Bande der Größe von ca. 500 bp nachgewiesen werden (Spuren 1,3-5, WT). Mit dem Primerpaar Fha-3*/Fha-4^{W12} (3*/4^{W12}) wurde die Integration der 3'-Endes von Fhis3523-GI-2 in das Genom überprüft. Hierbei zeigte sich nur bei Klon 1 eine Bande der erwarteten Größe von ca. 600 bp. Das Bandenmuster der Klone 3-5 entsprach der mitgeführten Plasmidkontrolle von Fhis3523-GI-2.

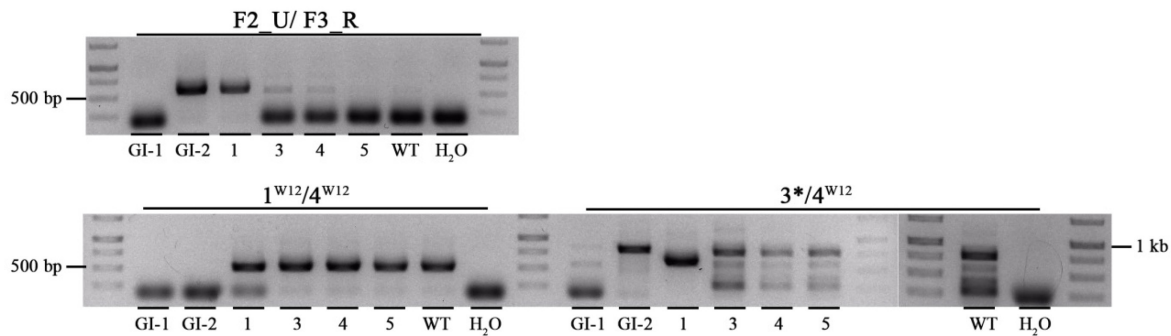


Abbildung 39: Weiterführende Überprüfung von ausgewählten Transformanten des Stammes *Francisella* sp. W12-1067. Genomische DNA der Transformanten wurde auf das Vorhandensein und die Integration von Fhis3523-GI-2 untersucht. Mit den Primern Phage_F2_out_U (F2_U) und Phage_F3_out_R (F3_R) wurde das Vorhandensein von Fhis3523-GI-2 gezeigt (Produkt: ca. 530 bp). Die Primer 1^{W12}/4^{W12} (Fha-1^{W12} und Fha-4^{W12}; Produkt: ca. 500 bp) weisen die chromosomale *attB*-Stelle nach und die Primer 3*/4^{W12} (Fha-3*/ Fha-4^{W12}; Produkt: ca. 600 bp) die Integration des 3'-Endes in das Genom. GI-1, pFhis3523-GI-1Cm; GI-2, pFhis3523-GI-2; WT, Wildtyp.

Für diese Klone konnte damit keine Integration des 3'-Endes in das Genom gezeigt werden. Für Klon 1 wurde auf Grund der erhaltenen Ergebnisse im Folgenden die Integration des 5'-Endes von Fhis3523-GI-2 in das Genom überprüft und auch, ob Fhis3523-GI-2 als Ringform in dem Klon vorliegt (Abbildung 40). Zur Überprüfung, ob Fhis3523-GI-2 als Ring vorliegt wurden die Primerkombination Phage_Km_KO_R/ Fha-3* genutzt. Als Kontrollen wurden neben genomischer DNA des *Francisella* sp. W12-1067 Wildtyps (WT) auch Plasmidpräparationen von pFhis3523-GI-1Cm (GI-1) und pFhis3523-GI-2 (GI-2) mitgeführt, sowie ein Teil des für die Transformation eingesetzten Ligationsproduktes. Während für Klon 1 ein Produkt der erwarteten Größe von ca. 1,1 kb nachgewiesen werden konnte, zeigten die Negativkontrollen nur unspezifische Bandenmuster. (Km_Ko_R/3*). Dieses Ergebnis zeigt, dass Fhis3523-GI-2 in einer Ringform vorliegt. Auch bei der Überprüfung mit den Primern Fha-1^{W12}/ Phage_Km_KO_R konnte für Klon 1 ein Produkt der erwarteten Größe von ca. 1000 bp und damit die Integration des 5'-Endes von Fhis3523-GI-2 in das Genom nachgewiesen werden (Abbildung 40, Spur 1). Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass

Fhis3523-GI-2 in die tRNA^{Val} des Stammes *Francisella* sp. W12-1067 integriert vorliegt und auch eine episomale Form bildet.

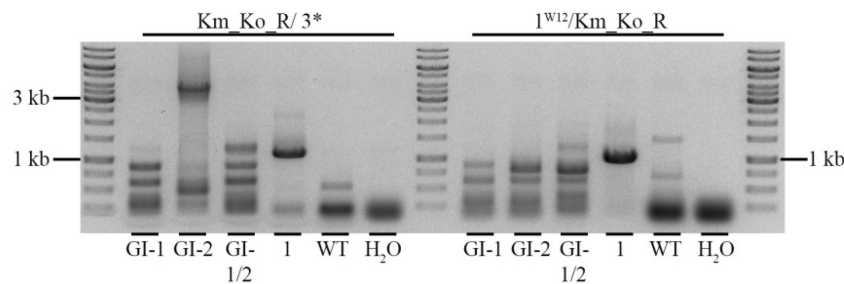


Abbildung 40: Ringbildung und Integration des 5'-Endes von Fhis3523-GI-2 im Stamm *Francisella* sp. W12-1067. Die Primer Km_Ko_R/3* (Phage_Km_KO_R/ Fha-3*; Produkt: ca. 1100 bp) weisen die Bildung der episomalen Form von Fhis3523-GI-2 nach und die Primer I^{W12}/Km_Ko_R (Fha-I^{W12}/ Phage_Km_KO_R; Produkt: ca. 1000 bp) die Integration des 5'-Endes in das Genom. GI-1, pFhis3523-GI-1Cm; GI-2, pFhis3523-GI-2; WT, Wildtyp.

Um Fhis3523-GI-1 ebenfalls in den Stamm einbringen zu können, sollte in das Konstrukt pFhis3523-GI-1Cm hinter das Gen FN3523_1010 eine zusätzliche *attR*-Stelle kloniert werden. Damit sollte nach Elektroporation in *Francisella* sp. W12-1067-GI-2 auch dieses Konstrukt aus dem Vektorrückgrat exzidieren können und in die tRNA^{Val} integrieren. Hierfür wurde die *attR*-Stelle aus dem Konstrukt FhaGI-1_attRL mit den Primern FhaGI-attR-F und FhaGI-attR-R amplifiziert. In die Sequenzen für die Primer wurden NotI-Schnittstellen integriert, um das spätere Einfügen in pFhis3523-GI-1Cm zu ermöglichen. Das PCR-Produkt wurde über TA-Klonierung in den Vektor pGEM-TEasy kloniert. Der Erfolg der Klonierung wurde durch PCR-Analysen und Sequenzierung des PCR-Produktes überprüft. Das Klonieren der *attR*-Stelle in pFhis3523-GI-1Cm konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erfolgreich durchgeführt werden.

Auch das Zusammenführen der beiden Hälften von FhaGI-1 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erreicht werden und bedarf weiterer Versuche.

4. Diskussion

Bei Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zu CRISPR/Cas-Systemen in *Francisella* spp. identifizierten Schunder et al. in fünf verschiedenen Spezies Spacer-Sequenzen, die alle ebenfalls in der gleichen chromosomalen Region des Stammes *Fhis* AS02-814 identifiziert werden konnten. Eine Überprüfung dieser Sequenzen führte zur Identifizierung der GI FhaGI-1, die in die tRNA^{Val} des Stammes *Fhis* AS02-814 integriert vorliegt. Durch Untersuchungen mit genomischer DNA konnten sowohl die in das Genom integrierte Form und die episomale Form der GI als auch die intakte tRNA^{Val} nachgewiesen werden (Niehaus, 2014; Rydzewski et al., 2015; Schunder et al., 2013). In dieser Arbeit sollten die genaueren Faktoren, die bei der Integration und Exzision der GI eine Rolle spielen, weiter analysiert und auch überprüft werden, ob sich die GI als Grundlage für die Entwicklung eines Integrationsvektors zur Verwendung in Francisellen eignet. Darüber hinaus sollten weitere Untersuchungen Aufschluss darüber geben, ob FhaGI-1 für einen funktionellen Phagen kodiert, da ein Großteil der kodierten Proteine Homologien zu Phagenproteinen aufweist (Schunder et al., 2013).

4.1 Die GI FhaGI-1

4.1.1 Funktionelle Charakterisierung von FhaGI-1

Der Stamm *Fhis* AS02-814 stand für genauere Untersuchungen nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde der Weg der synthetischen Herstellung verkürzter Varianten der GI gewählt, um Aufschluss über die Rolle der verschiedenen Teile der GI zu erhalten. Bei diesen Konstrukten wurden jene Teile, die für Bestandteile des putativen Phagenpartikels kodieren, nicht integriert. Lediglich Gene, welche vermutlich an der Regulation beteiligt sind, wurden aufgenommen. Durch PCR-Analysen der Konstrukte FhaGI-1_Reg und FhaGI-1_Int in *E. coli* konnten für beide sowohl die in das Vektorrückgrat integrierte Form als auch die episomale Form und das leere Vektorrückgrat mit der *attB*-Stelle nachgewiesen werden (Abbildung 9), was bedeutet, dass beide bereits im rekombinanten System voll funktionsfähig sind. Zudem deutet die Funktionalität von FhaGI-1_Int darauf hin, dass die Integrase allein im Zusammenspiel mit den *attL*- und *attR*-Stellen ausreichend für die Funktionalität des Konstruktes ist. Interessanter Weise unterscheiden sich die Konstrukte FhaGI-1_Reg-ΔInt und FhaGI-1_attRL bereits im rekombinanten System deutlich von den anderen beiden

Konstrukten. Während bei FhaGI-1_attRL erwartungsgemäß kaum episomale Form und auch nicht die intakte *attB*-Stelle nachgewiesen werden konnten, was bedeutet, dass dieses Konstrukt in *E. coli* nicht funktional ist, zeigt sich für FhaGI-1_Reg-ΔInt ein anderes Bild. Obwohl das Integrasegen hier nicht vorhanden ist, ist die episomale Form des Konstruktes unter normalen PCR-Bedingungen zumindest nachweisbar. Durch eine semiquantitative PCR konnte allerdings die signifikante Reduktion der Menge dieser Form gegenüber den Konstrukten FhaGI-1_Reg und FhaGI-1_Int nachgewiesen werden. Die intakte *attB*-Stelle ist genau wie bei FhaGI-1_attRL nicht nachweisbar, was darauf hindeutet, dass obwohl die episomale Form nachweisbar ist, in einem großen Teil der Bakterienzellen das Konstrukt in das Vektorrückgrat integriert vorliegt. In der integrierten Form ist das Konstrukt mit ca. 6700 bp zu groß, um unter den gewählten PCR-Bedingungen nachgewiesen werden zu können. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei der durch das Gen FN3523_1033 kodierten Tyrosin-Rekombinase um eine funktionale Integrase handelt, die an der Exzision der GI aus dem Chromosom beteiligt ist. Weiterhin wird deutlich, dass die Integrase nicht nur ausreichend, sondern auch notwendig für die vollständige Funktion der GI ist. Allerdings zeigen die unterschiedlichen Verhaltensweisen von FhaGI-1_Reg-ΔInt und FhaGI-1_attRL, dass auch die Gene FN3523_1026-1032 eine Rolle bei der Exzision und der Integration der GI zu spielen scheinen. Der durch das Gen FN3523_1028 kodierte putative Prophagenrepressor zeigt eine ähnliche Struktur wie der CI-Repressor des λ-Phagen, der bei diesem für das Aufrechterhalten des lysogenen Wachstums verantwortlich ist (Hochschild, 2002). Genau wie der CI-Repressor enthält dieses Protein eine LexA-Domäne, die bei diesem Protein ebenfalls für den recA-vermittelten Abbau verantwortlich sein könnte (Sauer et al., 1982). Das Gen FN3523_1027 kodiert für ein Protein, welches Ähnlichkeit zu dem Transkriptionsregulator Cro des temperenten *Salmonella* Phagen P22 aufweist. Zusammen mit dem CI-Repressor bildet der Cro-Repressor im λ-Phagen einen genetischen Schalter, der den Wechsel zwischen lysogener und lytischer Form des Phagen reguliert (Schubert et al., 2007). Eine Deletion des *cro*-Gens führt sowohl beim λ-Phagen als auch beim Phagen P22 dazu, dass diese nur noch lysogen und nicht mehr lytisch wachsen können (Folkmanis et al., 1977; Winston and Botstein, 1981). Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass ein Cro-ähnliches Protein eine wichtige Rolle bei der Konjugation der ICEs der STX/R91-Familie des Bakteriums *Vibrio cholerae* spielt und auch indirekt die Kopienzahl des ICE beeinflusst (Poulin-Laprade and Burrus, 2015). Damit erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass auch FN3523_1027 bei der Bildung der episomalen Form von FhaGI-1 zumindest indirekt beteiligt ist, wenn es genau wie Cro als Transkriptionsregulator fungiert. Auch das Gen FN3523_1026

könnte die Exzision beeinflussen, da dieses für ein putatives Phagenreplikationsprotein kodiert. Bei FN3523_1029-32 handelt es sich um Gene, die für hypothetische Proteine kodieren, deren Funktion nicht bekannt ist. Es besteht damit die Möglichkeit, dass sie für zusätzliche Faktoren wie RDFs kodieren, und damit die Richtung der Rekombination beeinflussen. Da nicht nur die einzelnen Gene in die Konstrukte integriert wurden, sondern der gesamte DNA-Abschnitt, können hiermit auch Bindungsstellen sowohl für phagen-kodierte Kofaktoren als auch wirtskodierte Proteine in der Sequenz enthalten sein, die die Richtung der Reaktion beeinflussen (Groth and Calos, 2004; Jayaram et al., 2015).

Da die Ergebnisse nur Informationen über die Funktionalität in *E. coli*, aber nicht über das Verhalten der Konstrukte in Francisellen liefern, wurden alle Konstrukte in den Stamm *Fth* LVS elektroporiert. Bereits bei der Bestimmung der Transformationseffizienz waren hier deutliche Unterschiede zu beobachten (Abbildung 10). Zwischen den Konstrukten FhaGI-1_Reg und FhaGI-1_Int ist auch in *Francisella* kein Unterschied in der Transformationseffizienz zu beobachten. Durch PCR-Analysen und Sequenzierungen konnten für beide Konstrukte sowohl die in das Genom integrierte als auch die exzidierte episomale Form nachgewiesen werden. Damit konnte die ortsspezifische Integration der Konstrukte in das Genom des Stammes *Fth* LVS und daraus folgend auch die Übertragbarkeit der verkürzten Varianten von FhaGI-1 auf andere *Francisella*-Spezies gezeigt werden. Zudem bestätigen diese Resultate die bereits im rekombinanten System beobachteten Ergebnisse und scheinen zu unterstreichen, dass die Integrase ausreichend für die Integration und Exzision der GI ist. Der Nachweis der intakten *attB*-Stelle zeigt weiterhin, dass nach der Exzision keine Kopie der Konstrukte im Genom verbleibt, was darauf hindeutet, dass die episomale Form nicht auf replikative Weise generiert wird. Für das Konstrukt FhaGI-1_Reg- Δ Int konnte in *Francisella* eine leichte, jedoch signifikante Reduktion in der Transformationseffizienz im Vergleich zu den Konstrukten FhaGI-1_Reg und FhaGI-1_Int festgestellt werden. Da die Transformationseffizienz ein Maß für die Menge der vorhandenen episomalen Form darstellen soll, bestätigt dieses Ergebnis die in *E. coli* durch PCR-Analysen gezeigte Reduktion der Menge an episomaler Form von FhaGI-1_Reg- Δ Int. Die PCR-Analyse der *Francisella*-Transformanden zeigt allerdings keine Unterschiede zu den anderen beiden Konstrukten. Im Gegensatz zum rekombinanten System konnte hier anhand der PCR keine Reduktion der Menge der episomalen Form festgestellt werden. Die beobachtete Integration kann eventuell durch unspezifische Rekombinasen des Stammes *Fth* LVS (FTL0290, FTL 1734 und RecA) erklärt werden. Diese Theorie wird durch die Ergebnisse des Konstruktes FhaGI-1_attRL noch weiter bestätigt. Für dieses Konstrukt konnte eine um den Faktor 1000

reduzierte Transformationseffizienz festgestellt werden, die im Einklang mit der in *E. coli* beobachteten Reduktion der episomalen Form steht. Die PCR-Analyse zeigte, dass auch für FhaGI-1_attRL sowohl die integrierte als auch die exzidierte episomale Form vorliegen. Da bei FhaGI-1_attRL neben der tRNA nur eine KmR sowie die *attR*-Stelle vorhanden sind, ist die beobachtete Integration nur durch unspezifische Rekombinasen und homologe Rekombination erklärbar. Die deutlich reduzierte Transformationseffizienz von FhaGI-1_attRL gegenüber FhaGI-1_Reg-ΔInt bestätigt zudem die bereits im rekombinanten System beobachteten Phänomene und verdeutlicht die Rolle, welche die Gene FN3523_1026-1032 offenbar bei den Prozessen der Integration sowie Exzision spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Rolle der Gene FN3523_1026-1032 nicht im Detail untersucht werden. Es wäre jedoch interessant zu untersuchen, welchen Einfluss die einzelnen Gene auf die Bildung der episomalen Form haben. Besonders das Gen FN3523_1028, welches für einen Prophagenrepressor kodiert, könnte die Menge der gebildeten episomalen Form beeinflussen. Lautner et al. konnten für die GI trb-1 des Stammes *Legionella pneumophila* Corby zeigen, dass die Deletion eines ähnlichen Regulatorgens zu einer erhöhten Kopienzahl der episomalen Form der GI führt (Lautner et al., 2013).

4.1.2 Die tRNA^{Val} als Integrationsort für GIs

Es ist bekannt, dass tRNAs häufig als Integrationsort für GIs und Phagen dienen (Reiter et al., 1989; Williams, 2002). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die tRNA^{Val} in Francisellen ebenfalls als genereller Integrationsort für GIs fungiert. Die Analyse der zur Verfügung stehenden Genome auf das Vorhandensein von Repeat-1 zeigte dabei, dass dieses in keinem anderen *Francisella*-Stamm nachweisbar ist. Allerdings konnte das sich in 12 Basen unterscheidende Repeat-1* in insgesamt vier *Fph*-Stämmen, sowie einem *Ftt*-Stamm und einem *Fno*-Stamm nachgewiesen werden. Die weitergehende Untersuchung der Genome der Stämme mit Repeat-1* führte zu der Identifizierung von FphGI-1 in den Stämmen *Fph* ATCC 25016, *Fph* ATCC 25017** und *Fph* ATCC 25018, in denen die GI vollkommen identisch aufgebaut ist und sich die Gene auch auf Nukleotidebene nicht voneinander unterscheiden. In den Stämmen *Fno* DPG 3A-IS und *Fno* FAI DR83 konnte eine GI nachgewiesen werden, die in ihrem Aufbau FphGI-1 ähnelt. Sie weist ein identisches Integrasegen, sowie dieselbe Repeat-Sequenz auf. Auch eine Gruppe von Genen, die möglicher Weise an der Replikation und Konjugation beteiligt ist, weist in dieser GI auf Proteinebene Identitäten zwischen 92% und 100% zu Genen von FphGI-1 auf. Im Gegensatz

zu FphGI-1 weist diese GI direkt neben der Integrase noch ein Transposasegen auf und umfasst damit nicht 18 ORFs wie FphGI-1, sondern 19 ORFs.

FphGI-1 unterscheidet sich ihrem Aufbau deutlich von FhaGI-1. Sie ist mit 23,7 kb sowohl deutlich kleiner als FhaGI-1 mit 34,3 kb und weist auch keinerlei Gene auf, die auf Proteinebene Homologien zu den Genen von FhaGI-1 besitzen. Interessanter Weise weist auch das Integrasegen von FphGI-1 (Fphi_1821) auf Proteinebene nur eine geringe Identität (25%) zur Integrase von FhaGI-1 auf, obwohl beide in das gleiche tRNA-Gen integrieren. Ein weiterer interessanter Unterschied ist, dass Fphi_1821 in Bezug auf die tRNA eine andere Orientierung aufweist als FN3523_1033. Fphi_1821 befindet sich am 5'-Ende der GI in direkter Nähe der tRNA^{Val} und ist zudem in die gleiche Richtung orientiert wie diese. Während die Gene von FphGI-1 keine Homologien zu FhaGI-1 aufweisen, sind einige der Gene, die für Proteine kodieren, die an der Konjugation und Replikation beteiligt sind, in den verschiedenen Stämmen, in denen die GI nachgewiesen werden konnte, konserviert. Dies scheint von Bedeutung, da es sich bei den Stämmen, in deren Genomen FphGI-1 nachgewiesen werden konnte, um verschiedene *Francisella*-Spezies handelt. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass dieses genetische Element zwischen den verschiedenen Spezies übertragen worden sein könnte. Für die GI des Stammes *Fph* GA01-2801 trifft dies nicht zu. Sie unterscheidet sich deutlich von FphGI-1 und ist mit knapp 49 kb wesentlich größer als diese. Zudem konnten in der gesamten GI nur zwei Gene identifiziert werden, die eine Homologie zu FphGI-1 aufweisen, wobei keines der beiden Gene eine Integrase darstellt. Allerdings konnten Gene mit einer Integrase-„core“-Domäne identifiziert werden, so dass die Möglichkeit besteht, dass eines dieser Gene die Funktion der Integrase in dieser GI übernimmt. Es stellt sich die Frage, ob die GI im Stamm *Fph* GA01-2801 ursprünglich ebenfalls FphGI-1 ähnelte und sich durch spätere Rekombinationsereignisse verändert hat, oder ob es sich um eine weitere GI handelt, die bei Francisellen in die tRNA^{Val} integriert vorliegt. Gegen letztere Theorie spricht, dass die GI von *Fph* GA01-2801 die identische kurze Repeat-Sequenz direkt neben der tRNA aufweist, die auch in FphGI-1 zu finden ist. Zudem stimmt die Repeat-Sequenz beider GIs bis auf eine Base überein. Es erscheint wahrscheinlicher, dass die GI sich im Laufe der Zeit, möglicher Weise beeinflusst durch den Verlust eines Integrasegens, verändert hat.

Insgesamt zeigt das Vorhandensein von FphGI-1 sowie der GI von *Fph* GA01-2801, dass die tRNA^{Val} in Francisellen als Integrationsort für GIs zu dienen scheint. Auf Grund der hier beschriebenen *in silico*-Analysen lassen sich allerdings keine Rückschlüsse auf die

Funktionalität der GIs ziehen. Ihr Vorhandensein liefert jedoch einen Hinweis darauf, dass horizontaler Gentransfer zwischen verschiedenen *Francisella*-Spezies möglich sein könnte. Für FphGI-1 war eine weitergehende Untersuchung möglich, da die Stämme *Fph* ATCC 25016 und *Fph* ATCC 25018 in der Arbeitsgruppe zur Verfügung standen.

4.1.3 Bedeutung von Repeat und Integrase

Durch PCR-Analysen genomischer DNA der Stämme *Fph* ATCC 25016 und *Fph* ATCC 25018 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es sich bei FphGI-1 im Gegensatz zu FhaGI-1 nicht um eine funktionale GI handelt, da zwar die in das Genom integrierte Form nachgewiesen werden konnte, jedoch nicht die episomale Form der GI (Abbildung 12). Der fehlenden episomalen Form können verschiedene Ursachen zugrunde liegen. Für einige integrative Elemente ist beschrieben, dass es bei der Integrationsreaktion zu Veränderungen des ehemaligen 3'-Endes der tRNA kommen kann. In einem solchen Fall ist die Exzisionsreaktion von Nachteil für den Wirt, da diese zu einem nicht funktionierenden tRNA-Gen führen würde (Williams, 2002). Damit könnte Repeat-1* mit seinen 12 veränderten Basen eine mögliche Erklärung für die fehlende episomale Form von FphGI-1 darstellen. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die Integrase von FphGI-1 (Fpi_1821) nicht funktional ist und aus diesem Grund die GI nicht exzidiert wird.

Um die Frage zu klären, ob die Integrase von FphGI-1 oder Repeat-1* mit den gegenüber Repeat-1 veränderten Basen verantwortlich für das Fehlen der episomalen Form von FphGI-1 ist, wurden neue synthetische Konstrukte genutzt (Abbildung 13 A). Der Einfluss der Integrase wurde durch das Konstrukt FhaGI-1_Int_{Fph} (b), welches bis auf das Integrasegen identisch mit FhaGI-1_Int ist, untersucht. Die Auswirkung, die Repeat-1* auf die Funktionalität der GI hat, wurde mit dem Konstrukt GhaGI-1_Reg-attR_{Fph} (c) analysiert. Dieses gleicht in seinem Aufbau, abgesehen von der Repeat-Sequenz, FhaGI-1_Reg. Bereits in *E. coli* zeigten beide Konstrukte einen deutlichen Einfluss auf die Funktionalität der GI. Sowohl für FhaGI-1_Int_{Fph} als auch für FhaGI-1_Reg-attR_{Fph} konnte kaum episomale Form nachgewiesen werden (Abbildung 13 B, 2*/3*). Damit verhalten sie sich in *E. coli* wie die mitgeführte „Nullkontrolle“ FhaGI-1_attRL. Folglich konnte für beide Konstrukte die intakte attB-Stelle auch kaum nachgewiesen werden, da sie in ihrer integrierten Form unter den gewählten PCR-Bedingungen zu groß für eine erfolgreiche Amplifikation sind. Zusätzlich haben PCR-Analysen der 5'- und 3'- Übergänge die Integration der Konstrukte in das Vektorrückgrat weiter bestätigt (Abbildung 13 B, 1^P/2* und 3*/4^P). Die PCR-Produkte der

Analysen der *attB*-Stelle wurden im Folgenden sequenziert. Während die Sequenzierung für das Konstrukt FhaGI-1_Int_{Fph} die korrekte Sequenz ergab, zeigte die Sequenzierung der *attB*-Stelle für FhaGI-1_Reg-attR_{Fph} hingegen, dass hier neben den erwarteten Basen von Repeat-1, die dem 3'-Ende der tRNA entsprechen, auch die Basen von Repeat-1* nachweisbar sind. Dies deutet auf eine nicht immer gleich ablaufende Exzision des Konstruktes hin. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Exzision des Konstruktes nicht immer ortsspezifisch abläuft, da neben dem erwarteten 500 bp großen Produkt zwei weitere PCR-Produkte identifiziert wurden, deren Sequenzierung zeigte, dass hier verschieden lange Segmente des Integrases vorhanden sind. Es besteht die Möglichkeit, dass diese fehlerhafte Exzision auf die Kombination der Integrase von FhaGI-1 mit dem Repeat von FphGI-1 zurückzuführen ist. Da Integrasen ihre *att*-Stellen spezifisch erkennen, könnte die veränderte Sequenz von Repeat-1* die Funktionsweise der Integrase beeinflussen.

Der Einfluss der Elemente von FphGI-1 wurde auch in *Francisella* analysiert. Nach den Ergebnissen aus dem rekombinanten System war es überraschend, dass sich die Konstrukte FhaGI-1_Int_{Fph} und FhaGI-1_Reg-attR_{Fph} in Francisellen sehr unterschiedlich verhalten. Schon durch die unterschiedliche Transformationseffizienz der beiden Konstrukte werden die verschiedenen Auswirkungen, die die beiden Elemente auf die Funktionalität der GI haben, sehr deutlich (Abbildung 16). Obwohl beide Konstrukte im rekombinanten System genau wie die mitgeführte Nullkontrolle FhaGI-1_attRL kaum bzw. keine episomale Form gezeigt haben, entspricht nur FhaGI-1_Int_{Fph} in seiner Transformationseffizienz der Nullkontrolle. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Integrase von FphGI-1 nicht funktional ist. Auch die durchgeführten PCR-Analysen verstärken diesen Eindruck. Zwar konnte in den erhaltenen Transformanden neben der episomalen Form auch die intakte tRNA^{Val} nachgewiesen werden, jedoch konnte die Integration des Konstruktes in das Genom des Stammes *Fth* LVS nur für das 5'-Ende gezeigt werden. Zusammen zeigen diese Ergebnisse deutlich, dass die Integrase von FphGI-1 in diesem System nicht funktional ist. Es ist jedoch zu beachten, dass sowohl die Position als auch die Orientierung des Integrases mit Bezug auf das tRNA^{Val}-Gen in dem Konstrukt gegenüber der Situation in FphGI-1 verändert wurden. Untersuchungen von Panis und Kollegen weisen darauf hin, dass beide Faktoren einen Einfluss auf die Regulation des Integrases haben können (Panis et al., 2010). Ein weiterer Unterschied zu der Situation in FphGI-1 besteht darin, dass die kurze Repeat-Sequenz, die sich in der GI unmittelbar vor der Integrase (Fphi_1821) befindet, nicht in dem Konstrukt enthalten ist. Da die Funktion dieser Sequenz nicht bekannt ist, könnte auch diese Veränderung einen Einfluss auf die Funktionalität der Integrase haben. Allerdings konnte auch

im Wildtyp keine episomale Form von FphGI-1 nachgewiesen werden, sodass es wahrscheinlich ist, dass die Integrase tatsächlich nicht funktional ist.

Für das Konstrukt FhaGI-1_Reg-attR_{Fph} konnte hingegen eine Transformationseffizienz, die vergleichbar mit der von FhaGI-1_Reg ist, gezeigt werden. Dies steht im Kontrast zu der Überlegung, dass die Transformationseffizienz mit der Menge der vorhandenen episomalen Form korrelieren könnte. Dieser Theorie folgend und auf Grund der PCR-Analysen aus *E. coli* sollte FhaGI-1_Reg-attR_{Fph} in seiner Transformationseffizienz FhaGI-1_attRL und FhaGI-1_Int_{Fph} ähneln. Eine Ursache für dieses Verhalten von FhaGI-1_Reg-attR_{Fph} wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt. Es kann nur vermutet werden, dass nach der Transformation in *Francisella* weitere Faktoren die Bildung der episomalen Form ermöglichen und damit zu dem Transformationserfolg führen. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die Gene FN3523_1026-1032 die Integration und Exzision von FhaGI-1_Reg-attR_{Fph}, ähnlich wie auch für die Konstrukte zur Charakterisierung von FhaGI-1 beschrieben, beeinflussen (siehe 4.1.1). Auch in den PCR-Analysen konnten alle Formen der GI nachgewiesen werden. Hier zeigte allerdings die Sequenzierung der PCR-Produkte, dass sich Repeat-1* zwar in der episomalen Form wiederfinden lässt, jedoch bei der integrierten Form des Konstruktes entgegen der Erwartungen nur Repeat-1 gefunden werden kann. Lediglich an zwei Positionen des 3'-Endes des Konstruktes konnten sowohl Basen, die sich Repeat-1 zuordnen lassen, als auch solche, die eindeutig zu Repeat-1* gehören, gefunden werden (Abbildung 17). Es stellt sich die Frage, wie es möglich ist, dass in der episomalen Form von FhaGI-1_Reg-attR_{Fph} Repeat-1* erhalten bleibt, während dieses in der integrierten Form nicht nachweisbar ist. Würde die Repeat-Sequenz bei der Replikation im Genom zu der Wildtypform, Repeat-1, konvertieren, müsste diese auch in der episomalen Form nachweisbar sein. Der Erhalt von Repeat-1* in der episomalen Form könnte also darauf hindeuten, dass die episomale Form sich unabhängig vom Genom replizieren kann. Dies ist z.B. für Pathogenitätsinseln des Stammes *Staphylococcus aureus* beschrieben, die als instabile Plasmide existieren können (Ubeda et al., 2007; 2008). Allerdings weist FhaGI-1_Reg-attR_{Fph} keinen bekannten Replikationsursprung für Francisellen auf, der einen Hinweis auf eine solche Verhaltensweise liefern würde. Zudem sollte auch eine selbst-replizierende episomale Form dazu in der Lage sein, in das Genom zu integrieren, womit Repeat-1* in der integrierten Form nachweisbar sein sollte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Frage nicht geklärt werden und bedarf gegebenenfalls weiterführender Untersuchungen.

Insgesamt haben die Versuche gezeigt, dass die fehlende Funktionalität von FphGI-1 anscheinend auf die nicht funktionierende Integrase zurückzuführen ist. Es wäre interessant, ob durch das Einbringen der Integrase von FhaGI-1 in die Stämme *Fph* ATCC 25016 und *Fph* ATCC 25018 die Bildung der episomalen Form von FphGI-1 herbeigeführt werden könnte. Ein positiver Verlauf eines solchen Versuchs würde die hier beschriebenen Ergebnisse weiter bestätigen.

4.2 FhaGI-1 als Integrationsvektor

4.2.1 Der Integrationsvektor pFIV1-Val

Die Untersuchungen mit den verkürzten Varianten von FhaGI-1 haben gezeigt, dass die Integrase in Kombination mit den *att*-Stellen ausreichend für die Bildung der episomalen Form in *E. coli* ist. Zudem haben die Versuche belegt, dass die episomale Form nach Transformation in *Francisella* ortsspezifisch in das tRNA^{Val}-Gen integriert. Auf Basis dieses Wissens wurde ein erster Integrationsvektor, pFhaGI-gfp-CmR genannt, konstruiert. Wie erwartet, zeigte die Überprüfung von *E. coli*-Transformanden, dass das Konstrukt in den drei möglichen Formen- episomal, integriert in das Vektorrückgrat und der leere Vektor mit *attB*-Stelle- vorliegt, und damit funktional ist. Als nächstes wurde die Integration des Vektors in Francisellen überprüft. Nach der positiven und negativen Selektion zeigten 30% der Transformanden eine Cm-Resistenz und eine Km-Sensitivität. Die PCR-Analysen dieser Klone bestätigten, dass diese das pUC-Kana-Rückgrat verloren haben und nur der FIV-Teil des Vektors in die tRNA^{Val} integriert bzw. in der episomalen Form vorliegt (Abbildung 20). Zudem zeigte die Analyse mit den Primern Fha-1 und Fha-4*, dass nach der Exzision keine Kopie des Vektors im Genom verbleibt. Dies weist darauf hin, dass die episomale Form des Vektors auf einem nicht replikativen Weg gebildet wird. Damit konnte gezeigt werden, dass der Vektor ortsspezifisch in das Genom integriert und dass die Folge positiver und negativer Selektionsschritte nur zu korrekten Klonen führt. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Konzept des Phagen-Integrationsvektors zumindest in *Fth* LVS funktioniert. Aus diesem Grund wurde das Konstrukt optimiert und der Vektor pFIV1-Val geschaffen.

Mit dem um MCS1 und MCS2 optimierten Vektor pFIV1-Val wurden weiterführende Untersuchungen durchgeführt. Die Expression von Genen, die in den Vektor integriert vorliegen, sollte durch die Komplementation einer *Fth* Δ *iglC*-Deletionsmutante gezeigt werden, von der bekannt ist, dass diese sich nicht intrazellulär vermehren kann (Golovliov et

al., 2003). In den durchgeführten Infektionsassays in der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie U937 konnte eine deutliche Komplementation des Vermehrungsdefektes der *Fth ΔiglC*-Deletionsmutante gezeigt werden, auch wenn keine hundertprozentige Wiederherstellung der Vermehrungsrate des Wildtyps erreicht wurde (Abbildung 23). Die nur fast vollständige Komplementation des Wachstumsdefektes könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass in der Deletionsmutante beide Kopien des *iglC*-Gens inaktiviert wurden (Golovliov et al., 2003; Lai et al., 2004) und die Expression des Gens von FIV-Val nicht stark genug ist, um diesen Defekt auszugleichen. Neben der erfolgreichen Komplementation konnte in dem Versuch außerdem gezeigt werden, dass der Vektor selbst keinerlei Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung der Francisellen hat und dass dieser auch ohne Selektionsdruck stabil in den Transformanden verbleibt.

In einem weiteren Infektionsassay wurde die Expression des Reportergens *gfp* untersucht. Die Beobachtungen mit dem Fluoreszenzmikroskop haben gezeigt, dass die Detektion fluoreszierender Bakterien möglich ist, deren Fluoreszenz jedoch eher schwach ausfällt (Abbildung 24). Dies bestätigt die Beobachtungen des Komplementationsassays und zeigt, dass Gene, die in pFIV1Val kloniert vorliegen, während der intrazellulären Replikation exprimiert werden. Durch das Einbringen eines weiteren *gfp*-Gens wurde das Fluoreszenzsignal verstärkt, was ein Hinweis darauf ist, dass die beobachtete schwache Fluoreszenz genau wie die unvollständige Komplementierung der *Fth ΔiglC*-Deletionsmutante vermutlich auf eine geringe Kopienzahl des Reportergens zurückgeführt werden kann. Eine weitere Bestätigung dieser Theorie geben die Versuche von LoVullo und Kollegen, die bei der Nutzung eines Tn7-basierten chromosomalen Integrationssystems eine ähnlich geringe Fluoreszenz beobachteten. Sie führten diese Ergebnisse auf eine Vielzahl möglicher Ursachen zurück, die neben der geringen Kopienzahl auch die Promotorstärke und eine falsche Faltung des GFPs umfassen (LoVullo et al., 2009a). Eine Bestätigung dieser Theorien liefern die Versuche von Su und Kollegen, die LoVullos Tn7-basierten Vektor durch den Einsatz eines stärkeren Promotors sowie eines optimierten *gfp*-Gens weiterentwickelten und damit Francisellen generieren konnten, die eine konstitutive und starke GFP-Fluoreszenz aufweisen (Su et al., 2013). Insgesamt konnte durch die Fluoreszenz Versuche erneut bestätigt werden, dass FIV1-Val auch ohne Selektionsdruck während eines Infektionsversuches stabil im Genom von *Fth* verbleibt.

4.2.2 Optimierung und weiterführende Charakterisierung der FIV-Vektoren

Durch die Einführung eines *sacB*-Gens in den nicht integrierenden Teil des Vektors wurde die neue Vektorvariante pFIV2-Val erschaffen, bei der auch das *gfp*-Gen entfernt und MCS1 und MCS2 zu MCS3 vereint wurden. Das *sacB*-Gen kodiert für eine sekretierte Levansucrase, die in Gegenwart von Sucrose toxisch für Gram-negative Bakterien ist (1985; Steinmetz et al., 1983). Damit konnte die Selektion positiver Klone auf einen Schritt reduziert werden, da auf sucrosehaltigem Agar mit Cm nur solche Klone wachsen können, bei denen FIV2-Val in das Genom integriert oder als episomale Form vorliegt und das pUC-Kana-Rückgrat verloren gegangen ist. Der Erfolg dieser gleichzeitigen positiven und negativen Selektion konnte durch PCR-Analysen gezeigt werden (Abbildung 26). Diese einfache Selektion hebt pFIV2-Val von anderen Plasmiden oder Integrationsvektoren für *Francisellen* ab, da diese entweder mehrere Runden der Selektion oder Helferplasmide benötigen (LoVullo et al., 2009a; Ludu et al., 2008). Neben der Zeitersparnis, die der einfache Selektionsschritt mit sich bringt, ist besonders im Hinblick auf Arbeiten mit hochpathogenen Stämmen eine einfache Handhabung von Vorteil.

Beide FIV-Val-Vektorvarianten wurden erfolgreich in andere *Francisella*-Spezies eingebracht. Neben den beiden *Fno*-Stämmen U112 und Fx1 konnten in der Arbeitsgruppe auch der neue *Francisella*-Stamm W12-1067 (Rydzewski et al., 2014) sowie ein *Fth* Umweltisolat, das aus einem Biber isoliert wurde (Schulze et al., 2016), mit FIV1-Val oder FIV2-Val transformiert werden. Dies zeigt, dass die FIV-Val-Vektoren für verschiedene *Francisella*-Spezies einsetzbar sind. Die Funktionalität der Vektoren in dem hochpathogenen Stamm *Ftt* konnte noch nicht untersucht werden, ist aber auf Grund der einfachen Handhabung der Vektoren sicher von Interesse. Nach der erfolgreichen Transformation der verschiedenen *Francisella*-Stämme wurde die Stabilität der FIV-Val-Vektoren ohne Selektionsdruck untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Vektoren in allen getesteten Stämmen auch nach 10 Passagen in Medium ohne Antibiotika stabil im Genom integriert bzw. als episomale Form vorliegen (Abbildung 27). Neben der stabilen Integration konnte auch die Expression des *gfp*-Gens im Western-Blot nachgewiesen werden. Hierbei fiel die Menge an GFP, wie auch schon bei den Infektionsassays beobachtet, im Stamm *Fth* LVS sowie in den *Fno*-Stämmen sehr gering aus. Durch mitgeführte Wildtypkontrollen der verschiedenen Stämme wird aber deutlich, dass es sich bei dem schwachen Signal nicht um Kreuzreaktionen handelt. Im Stamm *Francisella* sp. W12-1067 fällt die detektierte Menge an GFP deutlich höher aus als in den anderen untersuchten Spezies. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass

das speziell für die Nutzung in *Francisella* sp. W12-1067 eingebrachte Promotorelement hoch aktiv ist. Dagegen spricht allerdings, dass ähnliche Resultate in der Arbeitsgruppe mit anderen Plasmiden, die nur den GroES-Promotor vor einem *gfp*-Gen tragen, erhalten wurden (AG Heuner, unveröffentlichte Daten). Andere Ursachen für die unterschiedlichen GFP-Mengen könnten unterschiedlich hohe Vektorkopienzahlen in den verschiedenen Stämmen, sowie eine unterschiedliche Stabilität des GFP-Proteins sein (LoVullo et al., 2009a).

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Kopienzahl der Vektoren mittels Real-time-PCR ermittelt. Für beide Vektorvarianten konnten 3-4 Kopien nachgewiesen werden, womit die FIV-Val Vektoren zu den „*low-copy*“-Vektoren gehören. Dass für beide Vektorvarianten die gleiche Kopienzahl festgestellt wurde, ist nicht überraschend, da sie sich nur in dem nicht integrierenden Teil sowie der MCS unterscheiden und damit nach erfolgreicher Integration in Francisellen die gleichen Eigenschaften aufweisen sollten. Da die FIV-Val-Vektoren keinen Replikationsursprung für Francisellen besitzen, stellt sich allerdings die Frage, warum sie im Genom mit mehr als einer Kopie vorliegen. Bei beiden Varianten ist das Integrasegen in dem in das Genom integrierenden Teil enthalten. Damit kann bei beiden die episomale Form gebildet werden. Bereits die Ergebnisse der Untersuchungen zur Rolle von Repeat-1* (siehe Kapitel 3.1.3.2 und 4.1.3) ließen die Vermutung aufkommen, dass sich die episomale Form möglicher Weise unabhängig vom Genom replizieren könnte. Für das Plasmid-ähnliche Element pP36 des Stammes *Legionella pneumophila* Paris ist ebenfalls beschrieben, dass diese entweder in das Genom integriert oder als exzidiertes Plasmid mit mehreren Kopien vorliegen kann (Doléans-Jordheim et al., 2006). Eine solche vom Genom unabhängige Replikation könnte eine Erklärung für die hier nachgewiesene Kopienzahl darstellen. In einem solchen Fall könnten mehrere episomale Formen vorliegen, von denen jederzeit eine in das Genom integrieren könnte. In dieser Situation ließen sich durch PCR-Analysen gleichzeitig die integrierte Form, die episomale Form und auch die intakte *attB*-Stelle nachweisen. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, müssten weitergehende Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen nicht nur die Gesamtvektorkopien bestimmt werden, sondern die Menge der episomalen Form genauer untersucht wird. Allerdings haben die Versuche mit den verkürzten Varianten von FhaGI-1 gezeigt, dass auch ohne das Integrasegen noch episomale Form gebildet wird.

4.2.3 Weiterführende Vektorvarianten

In einem Versuch, die Exzision der Vektoren aus dem Genom und folglich die Bildung der episomalen Form zu verhindern, wurde eine dritte Vektorvariante, pFIV3-Val, geschaffen, bei der das Integrasegen auf den nicht integrierenden Teil des Vektors verschoben wurde. Damit sollte das Integrasegen bei der Selektion auf sucrosehaltigem Agar verloren gehen. Neben einer möglichen Reduktion der Kopienzahl des Vektors stellt die Vermeidung der Bildung der episomalen Form auch einen zusätzlichen Sicherheitsaspekt dar. Da bisher nicht geklärt ist, ob die episomale Form möglicher Weise durch einen Mechanismus wie die natürliche Transformation auf andere Francisellen übertragen werden kann, könnten auf diesem Weg zumindest theoretisch jegliche Elemente, die in den Vektor integriert vorliegen, übertragen werden. In *E. coli* konnten die episomale und die integrierte Form sowie das „leere“ Vektorrückgrat mit der *attB*-Stelle nachgewiesen werden (Abbildung 29). Durch die Verwendung der pFIV3-Val spezifischen Primer Fha-3Cm und Fha-4Int, die in der CmR bzw. im Integrasegen binden, konnte hierbei auch gezeigt werden, dass das Integrasegen nach Bildung der episomalen Form in dem Vektorrückgrat verbleibt und in der episomalen Form nicht vorhanden ist. Wären die Formen nicht korrekt gebildet worden, wären keine PCR-Produkte nachweisbar gewesen. Nach der Transformation in *Fth* LVS konnte die korrekte Integration von FIV3-Val in das Genom gezeigt werden. Allerdings war in den zwei hier untersuchten Transformanden auch die episomale Form noch deutlich nachweisbar (Abbildung 30). Weiterführende PCR-Analysen zeigten, dass zwar das *SacB*-Gen in den Transformanden nicht mehr vorhanden ist, dass aber das gesamte Integrasegen noch in den Zellen vorliegt (Abbildung 31-32). Die Vermutung, dass durch den Selektionsdruck zwar das *sacB*-Gen verloren wurde, der Rest des pUC-Kana-Rückgrates jedoch noch vorhanden ist, wurde durch das Ausstreichen der Transformanden auf Km-haltigem Agar widerlegt. Wäre der Großteil des pUC-Kana-Rückgrates noch vorhanden, müssten die Transformanden Km-resistent sein. Die getesteten Transformanden wuchsen jedoch nicht auf Km-haltigem Agar. Eine weitere Theorie ist, dass die Integrase an die *attR*-Stelle gebunden vorliegt und deswegen eine richtige Trennung der Teile nicht möglich ist. Allerdings dürfte in diesem Fall auch der Nachweis der Integration des 3'-Endes von FIV3-Val in das Genom mit den genutzten Primern nicht möglich sein, da das Integrasegen in diesem Fall ebenfalls im Genom vorliegen müsste. Da die korrekte Integration des 3'-Endes jedoch nachgewiesen wurde, erscheint letztere Theorie unwahrscheinlich. Damit stellt sich die Frage, in welcher Form das Integrasegen in den Bakterien überdauert. Eine Replikation des potentiell vorliegenden Vektorrückgrates, auf dem sich das Gen befindet, sollte ohne einen Replikationsursprung

unmöglich sein. Es könnte sein, dass das Vektorfragment an einer anderen Stelle in das Genom der Transformanden integriert hat. In diesem Fall müsste auch die CmR dort integriert vorliegen, da der Übergang von der CmR zum Integrasegen durch PCR-Analysen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 31). Für die Überprüfung dieser Theorie müssten weitere PCR-Analysen mit Primern, die aus dem Element heraus zeigen, durchgeführt werden und die Produkte anschließend sequenziert werden. Auf diese Weise ließe sich durch den Vergleich der Sequenzen mit dem Genom feststellen, an welcher Position sich das Element befindet. Alternativ zu den PCR-Analysen könnte eine Sequenzierung des kompletten Genoms der Transformanden durch „whole genome sequencing“ (WGS) und ein anschließender Vergleich mit dem Genom des Wildtyps ebenfalls Aufschluss über eine mögliche Integration des Vektorrestes geben. Sollte der Vektorrest jedoch nicht in das Genom integrieren, sondern episomal vorliegen, könnte ein wiederholtes Passagieren der Transformanden dazu führen, dass der Vektorrest aus den Zellen verloren geht. Jedoch würde eine solche Verfahrensweise den Vorteil der eigentlich einfachen Selektion der FIV-Val-Vektoren zunichte machen. Allerdings sollte zunächst eine größere Zahl an Transformanden darauf getestet werden, ob die Transformation mit FIV3-Val immer zu einem Verbleib des Integrasegens führt. Sollte dies der Fall sein, wäre dies ein Hinweis darauf, dass die veränderte Position des Integrasegens in Bezug auf die *attR*-Stelle einen Einfluss auf die Funktionalität des Vektors in *Francisella* hat. Damit müssten alternative Möglichkeiten überlegt werden, den Einfluss des Integrasegens zu minimieren. Eine Idee wäre das Integrasegen mit Resolvase-Erkennungsstellen zu flankieren. Bei anderen Integrationssystemen werden solche Stellen unter anderem dazu genutzt, um unerwünschte Antibiotikaresistenzkassetten in einem zusätzlichen Selektionsschritt zu deletieren (LoVullo et al., 2009a). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, das Integrasegen auf ein Helferplasmid zu setzen, welches durch einen negativen Selektionsschritt aus den Zellen zu einem gewünschten Zeitpunkt deletiert werden kann. Dieser Weg setzt voraus, dass die Integrase *in trans* wirken kann, was bisher noch nicht genauer untersucht wurde. Beide beschriebenen Varianten benötigen allerdings zusätzliche Selektionsschritte. Eine Alternative hierzu könnte darin bestehen, das Integrasegen in den Transformanden zu belassen, jedoch unter die Kontrolle eines induzierbaren Promotors zu setzen. Sowohl für *Ft* als auch in *Fno* existieren Plasmide, bei denen die Expression der Gene erfolgreich durch einen tetR-regulierten Promotor induziert werden kann (Brodmann et al., 2018; LoVullo et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit konnte zwar keine Version von pFIV3-Val generiert werden, bei der das Integrasegen in den *Francisella*-Transformanden nicht mehr vorhanden ist, jedoch bestehen

wie zuvor beschrieben verschiedene Möglichkeiten, dieses Ziel zu erreichen, sollte der hier gewählte Weg sich weiter als ungünstig erweisen.

Insgesamt haben die Versuche gezeigt, dass sich FhaGI-1 als Grundlage für einen *Francisella*-Integrationsvektor eignet, der in verschiedenen *Francisella*-Spezies einsetzbar ist. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass auch andere GIs von Francisellen als Grundlage für Integrationsvektoren genutzt werden können.

Mit jeder GI, die einen anderen Integrationsort aufweist, könnten so weitere Gene in dasselbe Bakterium stabil eingebracht werden. Eine bereits identifizierte GI ist FphGI-2 des Stammes *Fph* TX07-7308, die in die tRNA^{Met} integriert vorliegt (Abbildung 41). Genau wie bei FhaGI-1 liegt das Integrasegen hier am 3'-Ende der GI und ist in die entgegengesetzte Richtung wie die tRNA orientiert. Durch den Austausch der tRNA, des Integrasegens und der *attR*-Stelle sollte eine Veränderung des Integrationsortes des FIV-Vektors möglich sein. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass FphGI-2 eine episomale Form bilden kann, was bisher noch nicht überprüft werden konnte, da der Stamm in der Arbeitsgruppe nicht zur Verfügung steht.

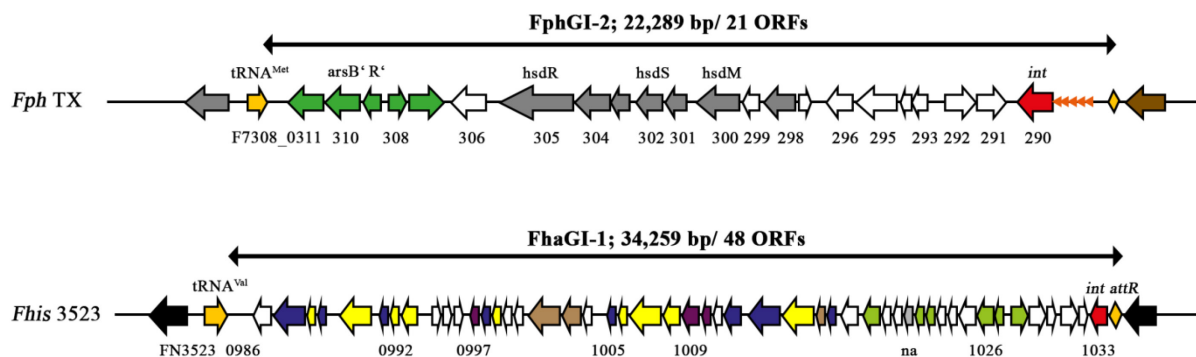


Abbildung 41: Die GI FphGI-2 des Stammes *Fph* TX07-7308 im Vergleich zu FhaGI-1. Die GI FphGI-2 liegt in die tRNA^{Met} des Stammes *Fph* TX07-7308 (*Fph* TX) integriert vor. Orangener Pfeil, tRNA; dunkelgrüne Pfeile, Gene einer Arsenresistenz; graue Pfeile, Gene eines TypI Restriktionsmodifikations-Systems; weiße Pfeile, hypothetische Proteine; hellblaue Pfeile, Proteine mit identifizierten Motiven; Pfeile in gelb, dunkelblau, hellgrün und braun, Gene die für den putativen Prophagen von *Fhis* AS02-814 kodieren; roter Pfeil, Integrasegen; orangene Raute, attR-Stelle; orangene Dreiecke stellen eine kurze 12 Basen lange Repeat-Sequenz der Basenfolge „CTGGGTAACAAA“ dar. *Fph* TX, *Fph* TX07-7308; *Fhis* 3523, *Fhis* AS02-814. Referenznummern der Genome siehe Kapitel 2.1.2

4.3 Ist FhaGI-1 ein Phage?

In Francisellen gibt es bis heute wenig Hinweise auf horizontalen Gentransfer und auch ein für Francisellen spezifischer Bakteriophage konnte bisher nicht isoliert werden (Sampson and Weiss, 2013; Siddaramappa et al., 2011; Sridhar et al., 2012). Damit war es von großem Interesse, ob es sich bei FhaGI-1 um einen funktionalen Phagen handelt. Da der Stamm *Fhis* AS08-14 für diese Untersuchungen nicht zu Verfügung stand sollte die gesamte Sequenz von FhaGI-1 durch eine Firma synthetisch hergestellt werden. Damit bei diesem Prozess kein funktionaler Phage entsteht, wurde die Sequenz in zwei Hälften geteilt. Dabei wurden alle Gene, die am Aufbau des putativen Phagen beteiligt sein könnten, in das Konstrukt Fhis3523-GI-1 und die Gene, die putativ regulatorische Funktionen haben, in das Konstrukt Fhis3523-GI-2 integriert. Um eine Selektion später zu vereinfachen, wurde zudem in die erste Hälfte ein *gfp*-Gen und in die zweite Hälfte eine KmR eingebracht.

4.3.1 Klonierung von Fhis3523-GI-2

Das zweite Konstrukt konnte die Firma nicht fertigstellen und so wurde das Konstrukt Fhis3523-GI-2 in vier einzelnen Teilen geliefert. Der Prozess des Zusammenführens der vier einzelnen Teile erwies sich als sehr langwierig. Ein Grund dafür lag in dem zweiten Klonierungsschritt, bei dem drei der Fragmente gleichzeitig ligiert wurden (Abbildung 34). Zwar sollten durch die verwendeten Restriktionsenzyme nur spezifische DNA-Überhänge entstehen, so dass die Ligation der Fragmente nur auf eine Weise möglich sein sollte, jedoch konnte keinerlei Selektionsdruck aufgebaut werden. Hinzu kommt, dass bei zwei Fragmenten die Überhänge aus nur drei Basen bestanden, die sich auch nur in einer dieser Basen unterschieden haben. Damit ist es vorstellbar, dass bei der Ligation auf Grund des mangelnden Selektionsdrucks diese Fragmente ligiert wurden, was zu der Vielzahl an zu testenden Klonen geführt haben könnte. Der Ligationsschritt war schließlich erfolgreich und die korrekte Verbindung der verschiedenen Fragmente konnte mittels PCR-Analysen nachgewiesen werden (Abbildung 35). Durch den finalen Klonierungsschritt wurde Fragment 1 in das neu entstandene Konstrukt F5 eingebracht. Da Fragment 1 eine KmR enthält, konnte ein entsprechender Selektionsdruck aufgebaut werden und die Zahl der zu testenden Klone reduzierte sich. Mit erfolgreichem Abschluss dieses Klonierungsschrittes lag Fhis3523-GI-2 in der Form vor, wie es für den Beginn dieser Arbeit geplant war.

4.3.2 Das Zusammenführen der Hälften von FhaGI-1

Beide Hälften von FhaGI-1 weisen durch die zusätzlich eingebrachten Gene eine Größe von ungefähr 18,5 kb auf. Fhis3523-GI-1 liegt dabei im Vektor pET-28b+ und Fhis3523-GI-2 im Vektor pUC57 vor. Es wurde davon ausgegangen, dass das Klonieren einer der Hälften in den jeweils anderen Vektor und eine anschließende Amplifikation in *E. coli* auf Grund der Größenverhältnisse schwierig sein würde. Aus diesem Grund wurden beide Hälften aus ihrem Vektorrückgrat ausgeschnitten, ligiert und direkt in den Stamm *Fth* LVS transformiert. Theoretisch sollten die beiden Hälften nach der Ligation als episomale Form von FhaGI-1 vorliegen und damit nach der Transformation in das Genom der Franciselle integrieren können. Die Selektion positiver Klone sollte auf Km-haltigem Agar erfolgen, führte aber nicht zum Erhalt positiver Transformanden. Eine mögliche Erklärung für den mangelnden Erfolg dieser Klonierungsstrategie ist, dass es sich bei den beiden Hälften von FhaGI-1 um sehr große Fragmente handelt, die zudem die gleiche Größe aufweisen. Es ist denkbar, dass die beiden Hälften unter den gewählten Bedingungen nicht richtig ligieren und damit auch keine episomale Form gebildet werden konnte, welche dann in das Genom integrieren sollte.

Nachdem die erste Klonierungsstrategie nicht erfolgreich war, wurde eine alternative Strategie überlegt, bei der beide Hälften zuerst im pET-Vektorrückgrat vereint und anschließend in *E. coli* transformiert werden sollten. Um die Selektion positiver Klone nach der Ligation zu vereinfachen wurde die KmR des pET-28-Vektors durch eine CmR ersetzt. Da sich in der Arbeitsgruppe gezeigt hatte, dass der Stamm *Francisella* sp. W12-1067 sich sehr gut mit den FIV-Val-Vektoren transformieren lässt und auch eine gute Expression der enthaltenen Gene zeigt, wurde dieser Stamm ebenfalls transformiert. In *E. coli* führte dieser Ansatz nicht zum Erhalt von Transformanden. Für den ausbleibenden Erfolg können verschiedene Erklärungen gefunden werden. Zum einen ist es möglich, dass die Integration von Fhis3523-GI-2 in pFhis3523-GI-1Cm nicht funktioniert hat. Eine PCR-Analyse des Ligationsproduktes, die hierüber Aufschluss geben könnte, wurde allerdings nicht durchgeführt. Für *E. coli* ist beschrieben, dass die Transformationseffizienz der Elektroporation mit zunehmender Plasmidgröße abnimmt (Chan et al., 2002; Hanahan, 1983). Im Fall einer erfolgreichen Ligation von Fhis3523-GI-2 und pFhis3523-GI-1 Cm weist das entstehende Plasmid eine Größe von über 40 kb auf und könnte damit den Transformationserfolg deutlich reduzieren. Ein weiterer Faktor, der den Erfolg der Klonierung in *E. coli* beeinflussen kann, ist der hier als Vektorrückgrat verwendete Vektor pET-28b. Dieser ist für die Klonierung von Fragmenten der hier eingesetzten Größe nicht gut geeignet.

Da eine Klonierung der gesamten GI in *E. coli* ursprünglich nicht geplant war und der Vektor für die Klonierung der einzelnen Hälften ausreichend ist, wurde dieser beibehalten. Für den Fall, dass eine Klonierung in *E. coli* weiterverfolgt werden soll, sollte ein anderes Vektorsystem, wie ein Cosmidvektor oder ein BAC („*bacterial artificial chromosome*“=artifizielles Bakterienchromosom), das auf die Klonierung großer Fragmente ausgelegt ist, verwendet werden.

Im Gegensatz zu *E. coli* führte die Transformation des Stammes *Francisella* sp. W12-1067 zu Klonen. Die PCR-Analyse dieser Klone zeigte, dass diese zwar nicht Fhis3523-GI-1 enthielten, jedoch Fhis3523-GI-2 (Abbildung 38). Dieses Phänomen lässt sich damit erklären, dass die Restriktion der Hälften von FhaGI-1 bei der gewählten Strategie mit nur einem Enzym, NotI, erfolgte, und folglich bei der Ligationsreaktion das ausgeschnittene Fhis3523-GI-2 auch mit sich selbst ligieren kann. In diesem Fall liegt Fhis3523-GI-2 als Ring vor, der sowohl das Integrasegen als auch die *attR*-Stelle enthält und damit alle Elemente besitzt, die für eine Integration in das Genom notwendig sind. Diese Theorie konnte durch PCR-Analysen belegt werden, die gezeigt haben, dass sowohl das 5'-Ende als auch das 3'-Ende von Fhis3523-GI-2 im Genom integriert vorliegen und auch eine Ringform vorhanden ist (Abbildung 35 und 36). Damit führte diese Strategie zwar auch nicht zum Zusammenführen der beiden Hälften, jedoch zu einem Stamm, in dem zumindest ein Teil der GI enthalten ist.

Auf Grundlage der erfolgreichen Integration von Fhis3523-GI-2 in das Genom der Francisellen wurde eine dritte Strategie für das Zusammenführen der beiden GI-Hälften überlegt. Durch das Einbringen einer zusätzlichen *attR*-Stelle in Fhis3523-GI-1 sollte es möglich sein, dass dieses Fragment nach Elektroporation in den Stamm *Francisella* sp. W12-1067 der bereits Fhis3523-GI-2 und damit die Integrase enthält, aus dem Vektorrückgrat exzidiert wird und eine episomale Form bildet, die dann ebenfalls in das Genom integrieren kann. Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Konstrukt mit der zusätzlichen *attR*-Stelle nicht mehr hergestellt werden. Jedoch ist dies inzwischen in der Arbeitsgruppe gelungen und es wurden auch Transformanden erzeugt, bei denen beide Hälften von FhaGI-1 nachgewiesen werden konnten.

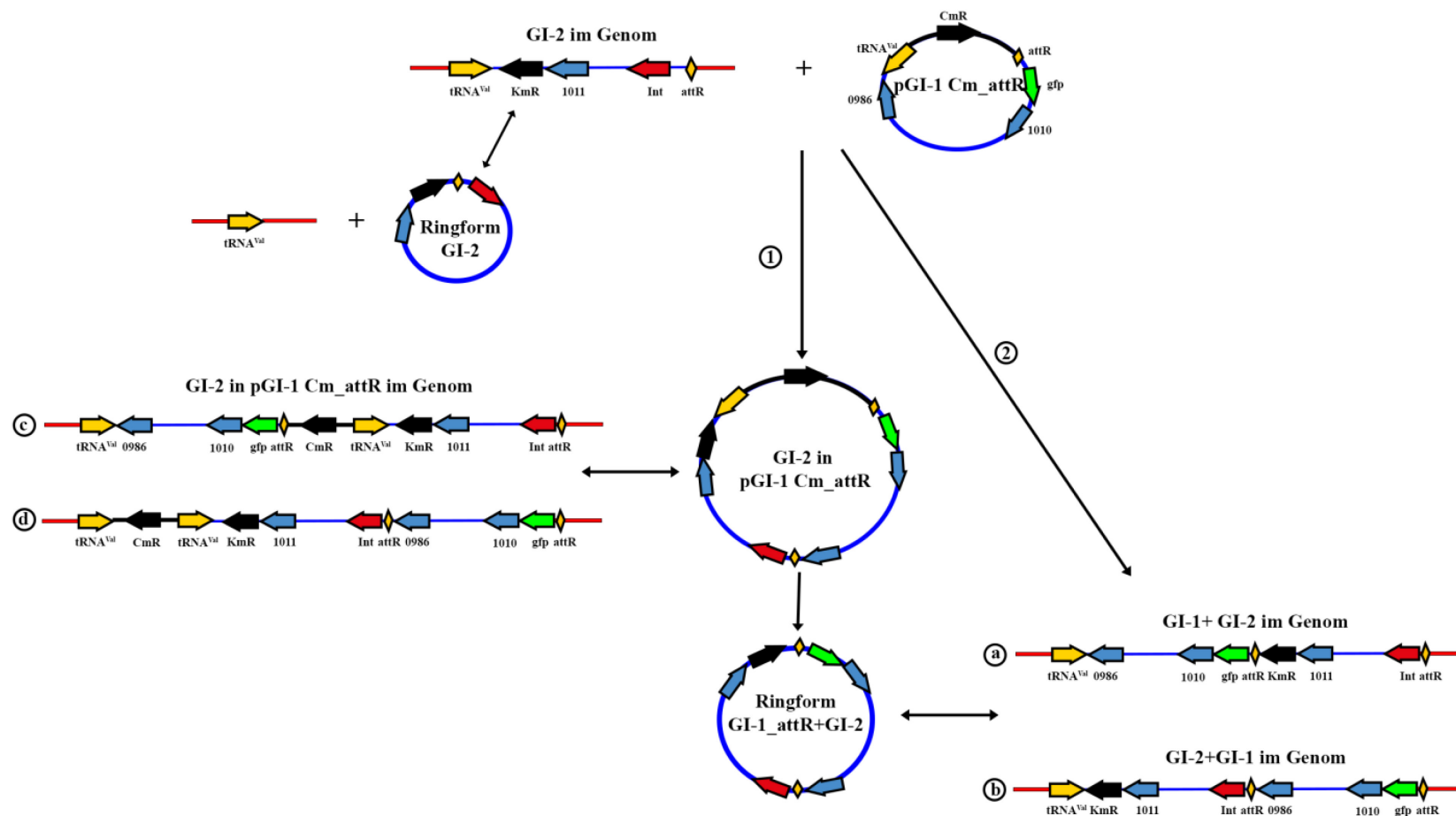


Abbildung 42: Schema der möglichen Integration von Fhis3523-GI-2 in Fhis3523-GI-1 Cm_attR. Gezeigt sind die möglichen Wege, auf die die beiden Hälften von FhaGI-1 im Stamm *Francisella* sp. W12-1067 zusammengeführt werden könnten. Schwarze Pfeile, Antibiotikaresistenzkassetten; blaue Pfeile, Gene von FhaGI-1; roter Pfeil, Integrase; orangener Pfeil, tRNA^{Val}; orangene Raute, attR-Stelle; schwarze Linie, pET-28-Vektor; rote Linie, Genom von *Francisella* sp. W12-1067; blaue Linie, FhaGI-1; pGI-1 Cm_attR, pFhis3523-GI-1 Cm_attR; GI-2, Fhis3523-GI-2.

In den Bakterien, in denen beide Hälften vorliegen, gibt es theoretisch verschiedene Möglichkeiten, wie beide Hälften zusammenfinden könnten (Abbildung 42). Es besteht zum einen die Möglichkeit, dass Fhis3523-GI-2 aus dem Genom exzidiert und sich in pFhis3523-GI-1 Cm_attR setzt (1). In diesem Fall wäre die Orientierung der beiden Hälften zueinander nicht wie in FhaGI-1, aber es bestünde dennoch die Möglichkeit, dass sie aus dem Vektorrückgrat exzidieren und gemeinsam in das Genom integrieren. Da eine episomale Form, bestehend aus den beiden Konstrukten, zwei *attR*-Stellen besitzt, ist die Integration in das Genom auf zwei Weisen möglich (a und b), wobei eine der beiden in der Orientierung der Gene der von FhaGI-1 entspricht (a). Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass das gesamte Konstrukt aus pFhis3523-GI-1 Cm_attR mit Fhis3523-GI-2 über eine der *attR*-Stellen in das Genom integriert. In diesem Fall würde das pET-28-Vektorrückgrat zusammen mit den beiden Teilen von FhaGI-1 in das Genom integrieren (c und d). Klone, bei denen die Integration auf die zuletzt beschriebene Variante abläuft, wären im Gegensatz zu den anderen Varianten der Integration weiter Cm-resistent. Zusätzlich ist es möglich, dass Fhis3523-GI-1 Cm_attR aus dem Vektorrückgrat exzidiert und sich direkt in das Genom integriert (2). In diesem Fall sollte die Orientierung der Gene der von FhaGI-1 entsprechen. Neben den beschriebenen Varianten kann es auch dazu kommen, dass beide Hälften in getrennten episomalen Formen vorliegen. Für den Stamm *Legionella pneumophila* Corby ist eine solche Situation für die GIs LpcGI-1 und LpcGI_2 beschrieben. In beiden GIs existieren zwei *attR*-Stellen und für beide GIs konnte die Bildung der episomalen Formen der einzelnen Teile nachgewiesen werden, wobei für LpcGI-1 die episomale Form der gesamten Insel nicht gezeigt werden konnte (Lautner et al., 2013).

4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die GI FhaGI-1 des Stammes *Fhis* AS02-814 genauer charakterisiert, sowie weitere GIs in anderen *Francisella*-Spezies identifiziert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass neben der ortsspezifische Integrase von FhaGI-1 (FN3523_1033) weitere Gene die Funktionalität der GI beeinflussen. Von besonderem Interesse könnten hierbei die Gene FN3523_1027 und FN3523_1028, die beide für putative Repressoren kodieren und eine ähnliche Rolle wie die CI- und Cro-Repressoren des λ -Phagen bei der Funktion der GI haben könnten. Um den Einfluss beider Gene genauer zu charakterisieren, könnten Varianten des Konstruktes FhaGI-1_Reg erstellt werden, bei denen

das eine oder das andere Gen deletiert wird. Anschließend sollte die Menge der episomalen Form im Vergleich zum ursprünglichen Konstrukt, z.B. mittels quantitativer Real-Time-PCR oder Digitaler Droplet PCR, ermittelt werden.

Die Untersuchungen mit der Integrase von FphGI-1 (Fphi_1821) haben gezeigt, dass diese vermutlich die Ursache für die Funktionslosigkeit der GI ist. Um dies weiter zu bestätigen könnte die Integrase von FhaGI-1 über ein Plasmid in den Stamm *Fph* ATCC 25016 eingebracht werden und anschließend geprüft werden, ob die episomale Form von FphGI-1 gebildet wird. Sollte dies der Fall sein, würde dies zusätzlich zeigen, dass die Integrase von FhaGI-1 auch *in trans* wirken kann.

Weiterhin haben die Untersuchungen dieser Arbeit gezeigt, dass sich FhaGI-1 als Grundlage für einen Integrationsvektor eignet, der ortsspezifisch und stabil in das Genom verschiedener Francisellen integriert. Die FIV-Vektoren können damit für Langzeituntersuchungen, z.B. zum Reservoir und zur Persistenz, eingesetzt werden. Es sollte weiter an einer Vektorvariante gearbeitet werden, bei der die episomale Form nicht gebildet wird. Es besteht die Möglichkeit, das Integrasegen auf ein Helferplasmid zu setzen, welches durch einen negativen Selektionsschritt deletiert werden kann. Ein weiterer Weg wäre das Integrasegen mit Resolvase-Stellen zu flankieren und es auf diese Weise zu entfernen. Alternativ zur Deletion des Integrasegens könnte auch versucht werden, es unter die Kontrolle eines induzierbaren Promotors zu stellen. Außerdem besteht die Option, den potentiellen Repressor, das Gen FN3523_1028, in den Vektor zu integrieren und so möglicher Weise die Bildung der episomalen Form zu unterbinden. Neben dieser Optimierung bietet es sich an zu versuchen den Integrationsort der Vektoren zu verändern. Hierfür könnte die Integrase und die *att*-Stellen durch die Elemente von FphGI-2, die in die tRNA^{Met} integriert vorliegt, ausgetauscht werden. Mit einer solchen zweiten Vektorvariante könnte man in denselben Stamm zwei verschiedene Gene stabil einbringen. Für eine gleichzeitige Integration von zwei Elementen in denselben Stamm wäre es weiterhin notwendig, dass beide verschiedene Antibiotikaresistenzkassetten besitzen. Hierfür, sowie für eine verbesserte Flexibilität beim Einsatz der Vektoren, könnte die CmR der pFIV-Val-Vektoren zum Beispiel durch eine Hygromycinresistenzkassette ausgetauscht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Klonierung von FhaGI-1 nicht fertiggestellt werden und ist damit weiterhin von großem Interesse. Für die Fertigstellung der Klonierung sollten Klone, die sowohl Fhis3523GI-1 Cm_attR als auch Fhis3523GI-2 enthalten, auf das Vorhandensein

der kompletten GI in korrekter Orientierung untersucht werden. Andererseits kann die Klonierung in *E. coli* mit einem Cosmidvektor, der für die Klonierung von Fragmenten dieser Größe ausgelegt ist, verfolgt werden. Nach erfolgreicher Klonierung könnte dann versucht werden, den putativen Phagen zu induzieren und Phagenplaques nachzuweisen oder mittels Elektronenmikroskopie Phagenpartikel zu zeigen. Zudem könnte überprüft werden, ob FhaGI-1 mittels Konjugation auf andere Francisellen übertragen werden kann. Seit Oktober 2018 ist der Stamm AS02-814 offiziell der Spezies *Fhis* zugeordnet. Auf Grund der niedrigeren Sicherheitseinstufung dieser Spezies könnte zudem erneut der Versuch unternommen werden, den Stamm vom CDC zu erhalten und die Untersuchungen mit der wildtypischen GI durchzuführen. Es ist jedoch auch möglich mit den bereits vorliegenden Hälften weitere Versuche durchzuführen. Auf Fhis3523GI-1 sind alle Sequenzen, die bei vorangegangenen Analysen in den Spacer-Sequenzen der CRISPR/Cas-Systeme anderer Francisellen identifiziert wurden, vorhanden, während Fhis3523GI-2 keine der Sequenzen enthält. Damit könnten beide Teile der GI auch für Studien zu CRISPR/Cas-Systemen in *Francisella* vergleichend eingesetzt werden.

Literaturverzeichnis

- Atlung, T., Nielsen, A., Rasmussen, L.J., Nellemann, L.J., Holm, F., (1991). A versatile method for integration of genes and gene fusions into the lambda attachment site of *Escherichia coli*. *Gene* 107, 11-17.
- Barker, J.R., Chong, A., Wehrly, T.D., Yu, J.J., Rodriguez, S.A., Liu, J., Celli, J., Arulanandam, B.P., Klose, K.E., (2009). The *Francisella tularensis* pathogenicity island encodes a secretion system that is required for phagosome escape and virulence. *Mol. Microbiol.* 74, 1459-1470.
- Bent, Z.W., Brazel, D.M., Tran-Gyamfi, M.B., Hamblin, R.Y., VanderNoot, V.A., Branda, S.S., (2013). Use of a capture-based pathogen transcript enrichment strategy for RNA-Seq analysis of the *Francisella tularensis* LVS transcriptome during infection of murine macrophages. *PLoS One* 8, e77834.
- Bertelli, C., Tilley, K.E., Brinkman, F.S.L., (2018). Microbial genomic island discovery, visualization and analysis. *Brief Bioinform.*
- Bina, X.R., Wang, C., Miller, M.A., Bina, J.E., (2006). The Bla2 beta-lactamase from the live-vaccine strain of *Francisella tularensis* encodes a functional protein that is only active against penicillin-class beta-lactam antibiotics. *Arch. Microbiol.* 186, 219-228.
- Biswas, T., Aihara, H., Radman-Livaja, M., Filman, D., Landy, A., Ellenberger, T., (2005). A structural basis for allosteric control of DNA recombination by lambda integrase. *Nature* 435, 1059-1066.
- Bönquist, L., Lindgren, H., Golovliov, I., Guina, T., Sjöstedt, A., (2008). MglA and Igl proteins contribute to the modulation of *Francisella tularensis* live vaccine strain-containing phagosomes in murine macrophages. *Infect. Immun.* 76, 3502-3510.
- Brevik, O.J., Ottem, K.F., Kamaishi, T., Watanabe, K., Nylund, A., (2011). *Francisella haliotica* sp. nov., a pathogen of farmed giant abalone (*Haliotis gigantea*) in Japan. *J. Appl. Microbiol.* 111, 1044-1056.
- Brodmann, M., Heilig, R., Broz, P., Basler, M., (2018). Mobilizable Plasmids for Tunable Gene Expression in *Francisella novicida*. *Front Cell Infect Microbiol* 8, 284.
- Brown, W.R., Lee, N.C., Xu, Z., Smith, M.C., (2011). Serine recombinases as tools for genome engineering. *Methods* 53, 372-379.
- Brüssow, H., Hendrix, R.W., (2002). Phage genomics: small is beautiful. *Cell* 108, 13-16.
- Buchrieser, C., Prentice, M., Carniel, E., (1998). The 102-kilobase unstable region of *Yersinia pestis* comprises a high-pathogenicity island linked to a pigmentation segment which undergoes internal rearrangement. *J. Bacteriol.* 180, 2321-2329.
- Buse, H.Y., Schaefer, F.W., III, Rice, E.W., (2017). Enhanced survival but not amplification of *Francisella* spp. in the presence of free-living amoebae. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 64, 17-36.

- Campbell, A., (2003). Prophage insertion sites. *Res. Microbiol.* 154, 277-282.
- Celli, J., Zahrt, T.C., (2013). Mechanisms of *Francisella tularensis* intracellular pathogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3, a010314.
- Challacombe, J.F., Petersen, J.M., Gallegos-Graves, V., Hodge, D., Pillai, S., Kuske, C.R., (2017a). Whole-Genome Relationships among *Francisella* Bacteria of Diverse Origins Define New Species and Provide Specific Regions for Detection. *Appl. Environ. Microbiol.* 83.
- Challacombe, J.F., Pillai, S., Kuske, C.R., (2017b). Shared features of cryptic plasmids from environmental and pathogenic *Francisella* species. *PLoS One* 12, e0183554.
- Chan, V., F Dreolini, L., A Flintoff, K., J Lloyd, S., A Mattenley, A., (2002). The Effect of Increasing Plasmid Size on Transformation Efficiency in *Escherichia coli*. *J Exp Microbiol Immunol* 2, 207-223.
- Clarridge, J.E., 3rd, Raich, T.J., Sjosted, A., Sandstrom, G., Darouiche, R.O., Shawar, R.M., Georgioui, P.R., Osting, C., Vo, L., (1996). Characterization of two unusual clinically significant *Francisella* strains. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1995-2000.
- Darling, R.G., Catlett, C.L., Huebner, K.D., Jarrett, D.G., (2002). Threats in bioterrorism. I: CDC category A agents. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 20, 273-309.
- Davies, E.V., Winstanley, C., Fothergill, J.L., James, C.E., (2016). The role of temperate bacteriophages in bacterial infection. *FEMS Microbiol. Lett.* 363, fnw015.
- Dennis, D.T., Inglesby, T.V., Henderson, D.A., Bartlett, J.G., Ascher, M.S., Eitzen, E., Fine, A.D., Friedlander, A.M., Hauer, J., Layton, M., Lillibridge, S.R., McDade, J.E., Osterholm, M.T., O'Toole, T., Parker, G., Perl, T.M., Russell, P.K., Tonat, K., Biodef, W.G.C., (2001). Tularemia as a biological weapon - Medical and public health management. *Jama-Journal of the American Medical Association* 285, 2763-2773.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., Hacker, J., (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 414-424.
- Doléans-Jordheim, A., Akermi, M., Ginevra, C., Cazalet, C., Kay, E., Schneider, D., Buchrieser, C., Atlan, D., Vandenesch, F., Etienne, J., Jarraud, S., (2006). Growth-phase-dependent mobility of the *lvh*-encoding region in *Legionella pneumophila* strain Paris. *Microbiology* 152, 3561-3568.
- Ellis, J., Oyston, P.C.F., Green, M., Titball, R.W., (2002). Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 631-646.
- Ericsson, M., Golovliov, I., Sandstrom, G., Tarnvik, A., Sjostedt, A., (1997). Characterization of the nucleotide sequence of the *groE* operon encoding heat shock proteins chaperone-60 and -10 of *Francisella tularensis* and determination of the T-cell response to the proteins in individuals vaccinated with *F. tularensis*. *Infect. Immun.* 65, 1824-1829.

- Esposito, D., Scocca, J.J., (1997). The integrase family of tyrosine recombinases: evolution of a conserved active site domain. *Nucleic Acids Res.* 25, 3605-3614.
- Fogg, P.C., Colloms, S., Rosser, S., Stark, M., Smith, M.C., (2014). New applications for phage integrases. *J. Mol. Biol.* 426, 2703-2716.
- Folkmanis, A., Maltzman, W., Mellon, P., Skalka, A., Echols, H., (1977). The essential role of the *cro* gene in lytic development by bacteriophage lambda. *Virology* 81, 352-362.
- Forsman, M., Henningson, E.W., Larsson, E., Johansson, T., Sandstrom, G., (2000). *Francisella tularensis* does not manifest virulence in viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 217-224.
- Forsman, M., Sandstrom, G., Sjostedt, A., (1994). Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 38-46.
- Fortier, L.C., Sekulovic, O., (2013). Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence* 4, 354-365.
- Gal-Mor, O., Finlay, B.B., (2006). Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell. Microbiol.* 8, 1707-1719.
- Ghosh, P., Kim, A.I., Hatfull, G.F., (2003). The orientation of mycobacteriophage Bxb1 integration is solely dependent on the central dinucleotide of attP and attB. *Mol. Cell* 12, 1101-1111.
- Glöckner, G., Albert-Weissenberger, C., Weinmann, E., Jacobi, S., Schunder, E., Steinert, M., Hacker, J., Heuner, K., (2008). Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (*trb/tra*) of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands. *Int. J. Med. Microbiol.* 298, 411-428.
- Golovliov, I., Sjostedt, A., Mokrievech, A., Pavlov, V., (2003). A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 222, 273-280.
- Gregory, M.A., Till, R., Smith, M.C.M., (2003). Integration Site for Streptomyces Phage BT1 and Development of Site-Specific Integrating Vectors. *J. Bacteriol.* 185, 5320-5323.
- Grindley, N.D., Whiteson, K.L., Rice, P.A., (2006). Mechanisms of site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 567-605.
- Groth, A.C., Calos, M.P., (2004). Phage Integrases: Biology and Applications. *J. Mol. Biol.* 335, 667-678.
- Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R., Goebel, W., (1990). Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb. Pathog.* 8, 213-225.

- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhlendorfer, I., Tschape, H., (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* 23, 1089-1097.
- Hacker, J., Carniel, E., (2001). Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* 2, 376-381.
- Hanahan, (1983). Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmid. *J. Mol. Biol.*
- Hepburn, M.J., Simpson, A.J., (2008). Tularemia: current diagnosis and treatment options. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 6, 231-240.
- Hoang, T.T., Kutchma, A.J., Becher, A., Schweizer, H.P., (2000). Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* 43, 59-72.
- Hochschild, A., (2002). The lambda switch: cI closes the gap in autoregulation. *Curr. Biol.* 12, R87-89.
- Hochschild, A., Lewis, M., (2009). The bacteriophage lambda CI protein finds an asymmetric solution. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 79-86.
- Hollis, D.G., Weaver, R.E., Steigerwalt, A.G., Wenger, J.D., Moss, C.W., Brenner, D.J., (1989). *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup *novicida* (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1601-1608.
- Howard-Varona, C., Hargreaves, K.R., Abedon, S.T., Sullivan, M.B., (2017). Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME J* 11, 1511-1520.
- Huber, B., Escudero, R., Busse, H.J., Seibold, E., Scholz, H.C., Anda, P., Kampfer, P., Splettstoesser, W.D., (2010). Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al. 1955) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1887-1896.
- Jayaram, M., Ma, C.H., Kachroo, A.H., Rowley, P.A., Guga, P., Fan, H.F., Voziyanov, Y., (2015). An Overview of Tyrosine Site-specific Recombination: From an FLP Perspective. *Microbiol Spectr* 3.
- Jensen, W.I., Owen, C.R., Jellison, W.L., (1969). *Yersinia philomiragia* sp. n., a new member of the *Pasteurella* group of bacteria, naturally pathogenic for the muskrat (*Ondatra zibethica*). *J. Bacteriol.* 100, 1237-1241.
- Jones, C.L., Napier, B.A., Sampson, T.R., Llewellyn, A.C., Schroeder, M.R., Weiss, D.S., (2012). Subversion of host recognition and defense systems by *Francisella* spp. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 383-404.
- Juhas, M., van der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W., Crook, D.W., (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 376-393.

- Lai, X.H., Golovliov, I., Sjostedt, A., (2004). Expression of IgIC is necessary for intracellular growth and induction of apoptosis in murine macrophages by *Francisella tularensis*. *Microb. Pathog.* 37, 225-230.
- Larson, C.L., Wicht, W., Jellison, W.L., (1955). A new organism resembling *P. tularensis* isolated from water. *Public Health Rep.* 70, 253-258.
- Larson, M.A., Nalbantoglu, U., Sayood, K., Zentz, E.B., Cer, R.Z., Iwen, P.C., Francesconi, S.C., Bishop-Lilly, K.A., Mokashi, V.P., Sjostedt, A., Hinrichs, S.H., (2016). Reclassification of *Wolbachia persica* as *Francisella persica* comb. nov. and emended description of the family *Francisellaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1200-1205.
- Lauer, P., Chow, M.Y.N., Loessner, M.J., Portnoy, D.A., Calendar, R., (2002). Construction, Characterization, and Use of Two *Listeria monocytogenes* Site-Specific Phage Integration Vectors. *J. Bacteriol.* 184, 4177-4186.
- Lautner, M., Schunder, E., Herrmann, V., Heuner, K., (2013). Regulation, integrase-dependent excision, and horizontal transfer of genomic islands in *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* 195, 1583-1597.
- Le Pihive, E., Blaha, D., Chenavas, S., Thibault, F., Vidal, D., Valade, E., (2009). Description of two new plasmids isolated from *Francisella philomiragia* strains and construction of shuttle vectors for the study of *Francisella tularensis*. *Plasmid* 62, 147-157.
- Lee, C.Y., Buranen, S.L., Ye, Z.H., (1991). Construction of single-copy integration vectors for *Staphylococcus aureus*. *Gene* 103, 101-105.
- Little, J.W., Shepley, D.P., Wert, D.W., (1999). Robustness of a gene regulatory circuit. *EMBO J.* 18, 4299-4307.
- LoVullo, E.D., Miller, C.N., Pavelka, M.S., Jr., Kawula, T.H., (2012). TetR-based gene regulation systems for *Francisella tularensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6883-6889.
- LoVullo, E.D., Molins-Schneekloth, C.R., Schweizer, H.P., Pavelka, M.S., Jr., (2009a). Single-copy chromosomal integration systems for *Francisella tularensis*. *Microbiology* 155, 1152-1163.
- LoVullo, E.D., Sherrill, L.A., Pavelka, M.S., Jr., (2009b). Improved shuttle vectors for *Francisella tularensis* genetics. *FEMS Microbiol. Lett.* 291, 95-102.
- LoVullo, E.D., Sherrill, L.A., Perez, L.L., Pavelka, M.S., Jr., (2006). Genetic tools for highly pathogenic *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. *Microbiology* 152, 3425-3435.
- Ludu, J.S., Nix, E.B., Duplantis, B.N., de Bruin, O.M., Gallagher, L.A., Hawley, L.M., Nano, F.E., (2008). Genetic elements for selection, deletion mutagenesis and complementation in *Francisella* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 278, 86-93.
- Maier, T.M., Havig, A., Casey, M., Nano, F.E., Frank, D.W., Zahrt, T.C., (2004). Construction and characterization of a highly efficient *Francisella* shuttle plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7511-7519.

- Martin, C., Mazodier, P., Mediola, M.V., Gicquel, B., Smokvina, T., Thompson, C.J., Davies, J., (1991). Site-specific integration of the *Streptomyces* plasmid pSAM2 in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 5, 2499-2502.
- McCaffrey, R.L., Schwartz, J.T., Lindemann, S.R., Moreland, J.G., Buchan, B.W., Jones, B.D., Allen, L.A., (2010). Multiple mechanisms of NADPH oxidase inhibition by type A and type B *Francisella tularensis*. *J. Leukoc. Biol.* 88, 791-805.
- McCoy, G., Chapin, C.W., (1912). Further observations on a plague like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent, bacterium tularense. *J. Infect. Dis.* 10, 61-72.
- Meinke, G., Bohm, A., Hauber, J., Pisabarro, M.T., Buchholz, F., (2016). Cre Recombinase and Other Tyrosine Recombinases. *Chem. Rev.* 116, 12785-12820.
- Moitoso de Vargas, L., Kim, S., Landy, A., (1989). DNA looping generated by DNA bending protein IHF and the two domains of lambda integrase. *Science* 244, 1457-1461.
- Nano, F.E., Zhang, N., Cowley, S.C., Klose, K.E., Cheung, K.K., Roberts, M.J., Ludu, J.S., Letendre, G.W., Meierovics, A.I., Stephens, G., Elkins, K.L., (2004). A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J. Bacteriol.* 186, 6430-6436.
- Nash, H.A., (1990). Bending and supercoiling of DNA at the attachment site of bacteriophage lambda. *Trends Biochem. Sci.* 15, 222-227.
- Niehaus, I.P., (2014). Untersuchungen zum CRISPR-Cas-1-System und zum putativen Phagen von *Francisella hispaniensis*. Bachelorarbeit, *Lebenswissenschaftliche Fakultät*, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Norqvist, A., Kuoppa, K., Sandstrom, G., (1996). Construction of a shuttle vector for use in *Francisella tularensis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 13, 257-260.
- Nunes-Duby, S.E., Kwon, H.J., Tirumalai, R.S., Ellenberger, T., Landy, A., (1998). Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res.* 26, 391-406.
- O'Shaughnessy, J.B., Chan, M., Clark, K., Ivanetich, K.M., (2003). Primer design for automated DNA sequencing in a core facility. *Biotechniques* 35, 112-116, 118-121.
- Ofir, G., Sorek, R., (2018). Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights. *Cell* 172, 1260-1270.
- Ohara, Y., Sato, T., Fujita, H., Ueno, T., Homma, M., (1991). Clinical Manifestations of Tularemia in Japan - Analysis of 1,355 Cases Observed between 1924 and 1987. *Infection* 19, 14-17.
- Olsufiev, N.G., Emelyanova, O.S., Dunayeva, T.N., (1959). Comparative study of strains of *B. tularense* in the old and new world and their taxonomy. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 3, 138-149.

- Oppenheim, A.B., Kobilier, O., Stavans, J., Court, D.L., Adhya, S., (2005). Switches in bacteriophage lambda development. *Annu. Rev. Genet.* 39, 409-429.
- Ottem, K.F., Nylund, A., Karlsbakk, E., Friis-Moller, A., Kamaishi, T., (2009). Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al. (2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1231-1243.
- Oyston, P.C., Sjostedt, A., Titball, R.W., (2004). Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 967-978.
- Ozanic, M., Marecic, V., Abu Kwaik, Y., Santic, M., (2015). The Divergent Intracellular Lifestyle of *Francisella tularensis* in Evolutionarily Distinct Host Cells. *PLoS Pathog.* 11, e1005208.
- Panis, G., Duverger, Y., Courvoisier-Dezord, E., Champ, S., Talla, E., Ansaldi, M., (2010). Tight regulation of the intS gene of the KplE1 prophage: a new paradigm for integrase gene regulation. *PLoS Genet* 6.
- Pavlov, V.M., Rodionova, I.V., Mokrievich, A.N., Meshcheriakova, I.S., (1994). Isolation and molecular-genetic characteristic of a cryptic plasmid from the *Francisella novicida* like F6168 strain. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.*, 39-40.
- Petersen, J.M., Mead, P.S., Schriefer, M.E., (2009). *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen. *Vet. Res.* 40, 7.
- Pomerantsev, A.P., Golovliov, I.R., Ohara, Y., Mokrievich, A.N., Obuchi, M., Norqvist, A., Kuoppa, K., Pavlov, V.M., (2001). Genetic organization of the *Francisella* plasmid pFNL10. *Plasmid* 46, 210-222.
- Poulin-Laprade, D., Burrus, V., (2015). A lambda Cro-Like Repressor Is Essential for the Induction of Conjugative Transfer of SXT/R391 Elements in Response to DNA Damage. *J. Bacteriol.* 197, 3822-3833.
- Ptashne, M., (2004). Two "what if" experiments. *Cell* 116, S71-72, 72 p following S76.
- Qu, P.H., Chen, S.Y., Scholz, H.C., Busse, H.J., Gu, Q., Kampfer, P., Foster, J.T., Glaeser, S.P., Chen, C., Yang, Z.C., (2013). *Francisella guangzhouensis* sp. nov., isolated from air-conditioning systems. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 3628-3635.
- Qu, P.H., Li, Y., Salam, N., Chen, S.Y., Liu, L., Gu, Q., Fang, B.Z., Xiao, M., Li, M., Chen, C., Li, W.J., (2016). *Allofrancisella inopinata* gen. nov., sp. nov. and *Allofrancisella frigidaquae* sp. nov., isolated from water-cooling systems, and transfer of *Francisella guangzhouensis* Qu et al. 2013 to the new genus as *Allofrancisella guangzhouensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 4832-4838.
- Radomski, N., (2013). Sequenzierung und Analyse des CRISPR/Cas Systems von zwei verschiedenen *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* Isolaten. Masterarbeit, Mathematisch Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt Universität zu Berlin.

- Rajeev, L., Malanowska, K., Gardner, J.F., (2009). Challenging a paradigm: the role of DNA homology in tyrosine recombinase reactions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 300-309.
- Ramsey, K.M., Osborne, M.L., Vvedenskaya, I.O., Su, C., Nickels, B.E., Dove, S.L., (2015). Ubiquitous promoter-localization of essential virulence regulators in *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog.* 11, e1004793.
- Reed, R.R., Grindley, N.D., (1981). Transposon-mediated site-specific recombination in vitro: DNA cleavage and protein-DNA linkage at the recombination site. *Cell* 25, 721-728.
- Reiter, W.D., Palm, P., Yeats, S., (1989). Transfer-Rna Genes Frequently Serve as Integration Sites for Prokaryotic Genetic Elements. *Nucleic Acids Res.* 17, 1907-1914.
- Ross, W., Landy, A., (1982). Bacteriophage lambda int protein recognizes two classes of sequence in the phage att site: characterization of arm-type sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 7724-7728.
- Rydzewski, K., Schulz, T., Brzuszkiewicz, E., Holland, G., Luck, C., Fleischer, J., Grunow, R., Heuner, K., (2014). Genome sequence and phenotypic analysis of a first German *Francisella* sp. isolate (W12-1067) not belonging to the species *Francisella tularensis*. *BMC Microbiol.* 14, 169.
- Rydzewski, K., Tlapák, H., Niehaus, I.P., Dabrowski, P.W., Grunow, R., Heuner, K., (2015). Identification and characterization of episomal forms of integrative genomic islands in the genus *Francisella*. *Int. J. Med. Microbiol.* 305, 874-880.
- Sampson, T.R., Weiss, D.S., (2013). Cas9-dependent endogenous gene regulation is required for bacterial virulence. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1407-1411.
- Saslaw, S., Eigelsbach, H.T., Prior, J.A., Wilson, H.E., Carhart, S., (1961). Tularemia vaccine study. II. Respiratory challenge. *Arch. Intern. Med.* 107, 702-714.
- Sauer, R.T., Ross, M.J., Ptashne, M., (1982). Cleavage of the lambda and P22 repressors by recA protein. *J. Biol. Chem.* 257, 4458-4462.
- Schlake, T., Bode, J., (1994). Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci. *Biochemistry* 33, 12746-12751.
- Schmidt, H., Hensel, M., (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 14-56.
- Schubert, R.A., Dodd, I.B., Egan, J.B., Shearwin, K.E., (2007). Cro's role in the CI Cro bistable switch is critical for λ 's transition from lysogeny to lytic development. *Genes Dev.* 21, 2461-2472.
- Schulze, C., Heuner, K., Myrtennas, K., Karlsson, E., Jacob, D., Kutzer, P., K, G.R., Forsman, M., Grunow, R., (2016). High and novel genetic diversity of *Francisella tularensis* in Germany and indication of environmental persistence. *Epidemiol. Infect.* 144, 3025-3036.

- Schunder, E., Rydzewski, K., Grunow, R., Heuner, K., (2013). First indication for a functional CRISPR/Cas system in *Francisella tularensis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 51-60.
- Segall, A.M., Goodman, S.D., Nash, H.A., (1994). Architectural elements in nucleoprotein complexes: interchangeability of specific and non-specific DNA binding proteins. *EMBO J.* 13, 4536-4548.
- Siddaramappa, S., Challacombe, J.F., Petersen, J.M., Pillai, S., Hogg, G., Kuske, C.R., (2011). Common ancestry and novel genetic traits of *Francisella novicida*-like isolates from North America and Australia as revealed by comparative genomic analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5110-5122.
- Siddaramappa, S., Challacombe, J.F., Petersen, J.M., Pillai, S., Kuske, C.R., (2014). Comparative analyses of a putative *Francisella* conjugative element. *Genome* 57, 137-144.
- Sjödin, A., Svensson, K., Ohrman, C., Ahlinder, J., Lindgren, P., Duodu, S., Johansson, A., Colquhoun, D.J., Larsson, P., Forsman, M., (2012). Genome characterisation of the genus *Francisella* reveals insight into similar evolutionary paths in pathogens of mammals and fish. *BMC Genomics* 13.
- Sjöstedt, A., (2007). Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1105, 1-29.
- Smith, M.C., Thorpe, H.M., (2002). Diversity in the serine recombinases. *Mol. Microbiol.* 44, 299-307.
- Smith, M.C., Till, R., Brady, K., Soultanas, P., Thorpe, H., Smith, M.C., (2004). Synapsis and DNA cleavage in phiC31 integrase-mediated site-specific recombination. *Nucleic Acids Res.* 32, 2607-2617.
- Soto, E., Griffin, M.J., Morales, J.A., Calvo, E.B., de Alexandre Sebastiao, F., Porras, A.L., Viquez-Rodriguez, X., Reichley, S.R., Rosser, T.G., Ware, C., Byrne, B.A., Garcia, J.C., LaFrentz, B.R., Camus, A.C., (2018). *Francisella marina* sp. nov., Etiologic Agent of Systemic Disease in Cultured Spotted Rose Snapper (*Lutjanus guttatus*) in Central America. *Appl. Environ. Microbiol.* 84.
- Sridhar, S., Sharma, A., Kongshaug, H., Nilsen, F., Jonassen, I., (2012). Whole genome sequencing of the fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* Toba04 gives novel insights into *Francisella* evolution and pathogenicity. *BMC Genomics* 13, 598.
- Steinmetz, M., Le Coq, D., Aymerich, S., Gonzy-Treboul, G., Gay, P., (1985). The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Mol. Gen. Genet.* 200, 220-228.
- Steinmetz, M., Le Coq, D., Djemia, H.B., Gay, P., (1983). Genetic analysis of *sacB*, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol. Gen. Genet.* 191, 138-144.

- Straskova, A., Cervený, L., Spidlova, P., Dankova, V., Belcic, D., Santic, M., Stulik, J., (2012). Deletion of IglH in virulent *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 strain results in attenuation and provides protection against the challenge with the parental strain. *Microbes Infect* 14, 177-187.
- Su, S., Saldanha, R., Pemberton, A., Bangar, H., Kawamoto, S.A., Aronow, B., Hassett, D.J., Lamkin, T.J., (2013). Characterization of stable, constitutively expressed, chromosomal green and red fluorescent transcriptional fusions in the select agent bacterium, *Francisella tularensis* Schu S4 and the surrogate type B live vaccine strain (LVS). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9029-9041.
- Takeda, Y., (1979). Specific repression of in vitro transcription by the Cro repressor of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* 127, 177-189.
- Thorpe, H.M., Wilson, S.E., Smith, M.C., (2000). Control of directionality in the site-specific recombination system of the *Streptomyces* phage phiC31. *Mol. Microbiol.* 38, 232-241.
- Tlapák, H., Köppen, K., Rydzewski, K., Grunow, R., Heuner, K., (2018). Construction of a New Phage Integration Vector pFIV-Val for Use in Different *Francisella* Species. *Front Cell Infect Microbiol* 8, 75.
- Ubeda, C., Barry, P., Penades, J.R., Novick, R.P., (2007). A pathogenicity island replicon in *Staphylococcus aureus* replicates as an unstable plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14182-14188.
- Ubeda, C., Maiques, E., Barry, P., Matthews, A., Tormo, M.A., Lasa, I., Novick, R.P., Penades, J.R., (2008). SaPI mutations affecting replication and transfer and enabling autonomous replication in the absence of helper phage. *Mol. Microbiol.* 67, 493-503.
- Wherry, W.B., Lamb, B.H., (1914). Infection of man with bacterium tularensis. *J. Infect. Dis.* 15, 331-U312.
- Whipp, M.J., Davis, J.M., Lum, G., de Boer, J., Zhou, Y., Bearden, S.W., Petersen, J.M., Chu, M.C., Hogg, G., (2003). Characterization of a *novicida*-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *J. Med. Microbiol.* 52, 839-842.
- Williams, K.P., (2002). Integration sites for genetic elements in prokaryotic tRNA and tmRNA genes: sublocation preference of integrase subfamilies. *Nucleic Acids Res.* 30, 866-875.
- Winston, F., Botstein, D., (1981). Control of lysogenization by phage P22. I. The P22 *cro* gene. *J. Mol. Biol.* 152, 209-232.

Anhang

Sequenzvergleich auf Aminosäureebene der Integrasen von *Fhis3523* (FN3523_1033) und *Fph 25017* (Fpi_1821):

Fph 25017	21	DTLGlyLRVDKNGNKTWQLRHTINEKRKWFGLSYPSTNLNEARKLSAELRERIDNGEDI	80
		D GL LRV +G K+++LR+TI KRK + +G S L +A+K + L I G D	
Fhis 3523	24	DISGLILRVFPSGIKSFRLRYTIGNKRKIYTIGKLGsITLTQAKKEAQRLIGLISQGIDP	83
Fph 25017	81	LAKPDAKKVI-----YVKDLVAQYIEFQKNSSSEDFIKKLTNISKNHIIIPKIGNRD	132
		+ + +K Y+ D + KN+ + +F S + KI ++	
Fhis 3523	84	VQERKSKTTSNHDITLREYINDFYDWNKNNKNTKALEF-----SLGRRLEKIMDKS	136
Fph 25017	133	IQTIKRKDCI-----DVLEPLIDKGATRNVLSALKGISRLARHNELIENDPTHDIARAL	187
		++ + K + D + AT N++LS LKG+ A IE + D+ L	
Fhis 3523	137	LKELNDKKVMIKYLN DYQKINKTSDATYNRMLSTLKG MFSRAYEFGYIETNNIKDV--KL	194
Fph 25017	188	PQYKAQPMPHISPLHNKSLKELLLDLN YTKGNYISRYALKLLPYIVLRPIELVSLQWD	247
		+ A + ++S + L L K I Y Y +R E+++L +D	
Fhis 3523	195	LKINATKVRYLSSETTRFFESLELITSQQAKEIIIIAY-----YTGMRKSEILTLTFD	248
Fph 25017	248	FYDAENSRIIIPAEIMKMRKDHIVCLSRQAKQIEELKDLQGGFKYFFPS	297
		D + +I++ +E K K + + + QI+ K+ + G Y F S	
Fhis 3523	249	DIDFDTKQIVLKSENTKSSKVRYIPMHEKVLQILSN-KNQKSG--YIFVS	295

Tabelle 15: Gene der GI von *Fph* GA01-2801 im Vergleich mit Genen des Stammes *Fph* ATCC 25017.

Gen (FphLA02_Nr.)	Amino- Säuren	Motive oder putative Funktion	25017 % AS-Ident.
tRNA ^{Val}			100*
1520	416		98 (Fphi_1836)
1521	66	AlpA	98
1522	181	hypothetisches Protein	/
1523	105	hypothetisches Protein	/
1524	107	hypothetisches Protein	/
1525	561	Integrase-, „core“- Domäne	/
1526	524	hypothetisches Protein	/
1527	401	VasE	
1528	210	hypothetisches Protein	/
1529	494	VipB	/
1530	147	VipA	/
1531	652	hypothetisches Protein	/
1532	261	Integrase-, „core“- Domäne	/
1533	459	hypothetisches Protein	/
1534	261	Integrase-, „core“- Domäne	/
1535	816	Glycosyl-Hydrolase Familie 20	Identität zu Fphi_0036 und Fphi_0037
1536	458	MFS Transporter, Zuckertransporter-Familie	99 (Fphi_0038)
1537	343	Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Transaminase	99 (Fphi_0039)
1538	424	Dicarboxylat-Symporter-Familie	99 (Fphi_0040)
1539	463	hypothetisches Protein	97 (Fphi_0041)
1540	205	hypothetisches Protein	99 (Fphi_0042)
1541	56	rubA1: Rubredoxin-1	100 (Fphi_0043)
1542	290	Pyridoxal-Phosphate abhängige Proteinfamilie	98 (Fphi_0044)
1543	518	hypothetisches Protein	Identität zu Fphi_0046 und Fphi_0045
1544	605	GTP-Bindeprotein TypA/BipA	99 (Fphi_0048)
1545	270	short chain dehydrogenase family protein	94 (Fphi_0049)
1546	581	ggt: Gamma-Glutamyltransferase	99 (Fphi_0050)
1547	305	vacJ-ähnliche Proteinfamilie	99 (Fphi_0051)
1548	400	mnmc: tRNA U-34 5-Methylaminomethyl-2- Thiouridin Biosyntheseprotein	97 (Fphi_0052)
1549	186	Transposase IS200-Familie	99 (Fphi_0053)

1550	101	rnfH Ubiquitin Familie	97 (Fphi_0054)
1551	143	putatives Toxin YfjG	100 (Fphi_0055)
1552	157	smpB: SsrA-Bindungsprotein	100 (Fphi_0056)
1553	256	PP-loop Familie	99 (Fphi_0057)
1554	334	Ribonuclease T2 Familie	Identität zu Fphi_0059 und Fphi_0060
1555	207	hisE: Phosphoribosyl-ATP Diphosphatase	99 (Fphi_0062)
1556	257	hisF: Imidazolglycerol Phosphatsynthase, Cyclaseuntereinheit	99 (Fphi_0063)
1557	241	hisA: 1-(5-Phosphoribosyl)-5-[(5- Phosphoribosylamino)Methylideneamino]- Imidazole-4-carboxamide isomerase	98 (Fphi_0064)
1558	198	hisH: Imidazol-Glycerol-Phosphatsynthase, Glutamin-Amidotransferaseuntereinheit	96 (Fphi_0065)
1559	358	hisB: Histidinol-Phosphatase	98 (Fphi_0066)
1560	361	hisC: Histidinol-Phosphat-Transaminase	98 (Fphi_0067)
1561	432	hisD: Histidinol-Dehydrogenase	97 (Fphi_0068)
1562	296	ATP Phosphoribosyltransferase	100 (Fphi_0069)
1563	98	trp Repressor-Familie	-
1564	193	Integrase-, „core“- Domäne	-
1565	44	Integrase-, „core“- Domäne	-
Repeat			98*

* = bp-Identität; AS = Aminosäuren; 25017 = *Fph* ATCC 25017; in Klammern sind die Gene des Stammes *Fph* 25017 angegeben, die eine Identität aufweisen.

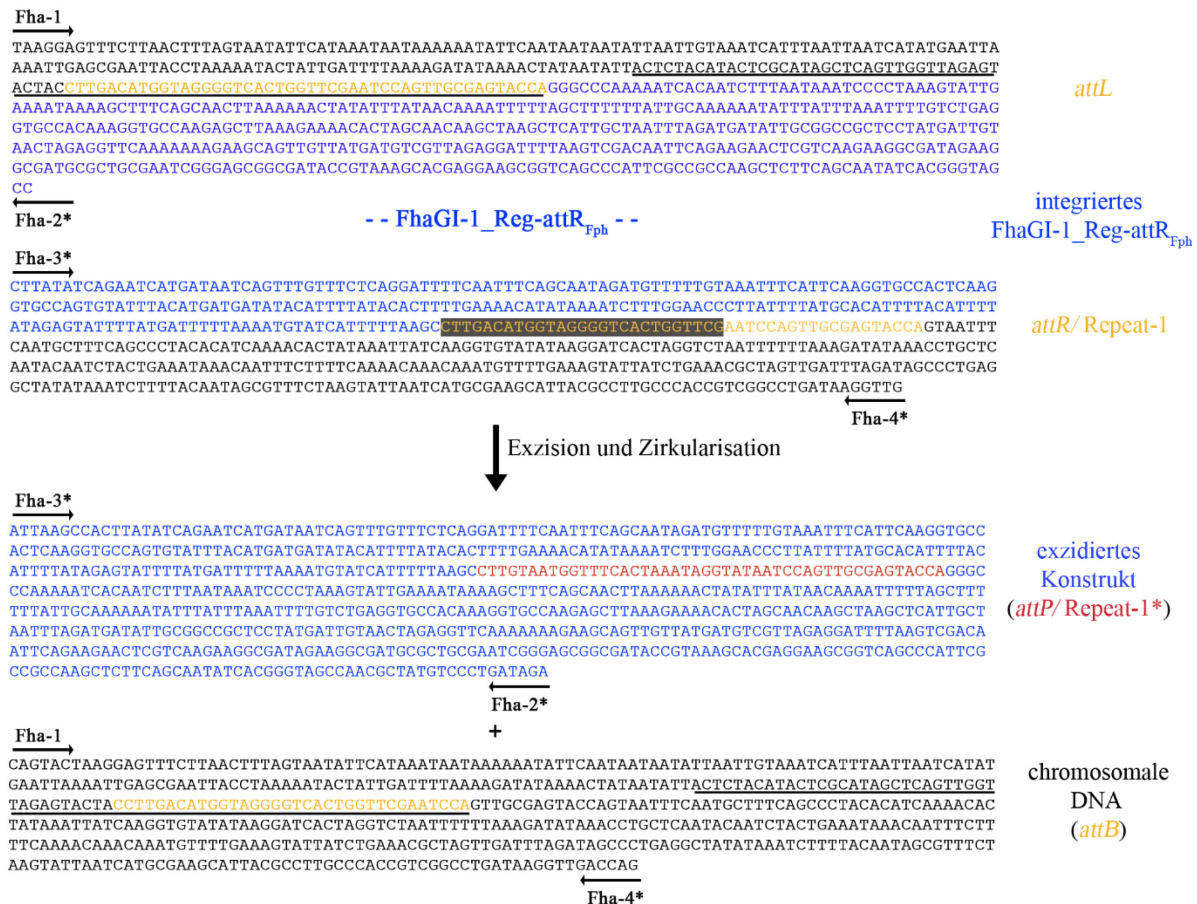


Abbildung 43: Auswertung der Sequenzen des in den Stamm *Fth* LVS integrierten FhaGI-1_Reg attR_{Fph}. Gezeigt sind die Nukleotidsequenzen der *attL*- und *attR*-Stellen sowie der *attP*- und *attB*-Stellen. DNA des Konstruktes ist in blau, genomische DNA in schwarz, Repeat-1 in gelb und Repeat-1* in rot dargestellt. Die Sequenz der tRNA^{Val} ist unterstrichen. Der Bereich der *attR*-Stelle, der Repeat-1* entsprechen sollte, ist grau hinterlegt. Positionen und Orientierung der für die PCRs verwendeten Primer sind durch Pfeile indiziert.

Schematische Darstellung des Klonierungsweges der pFIV-Val-Vektoren:

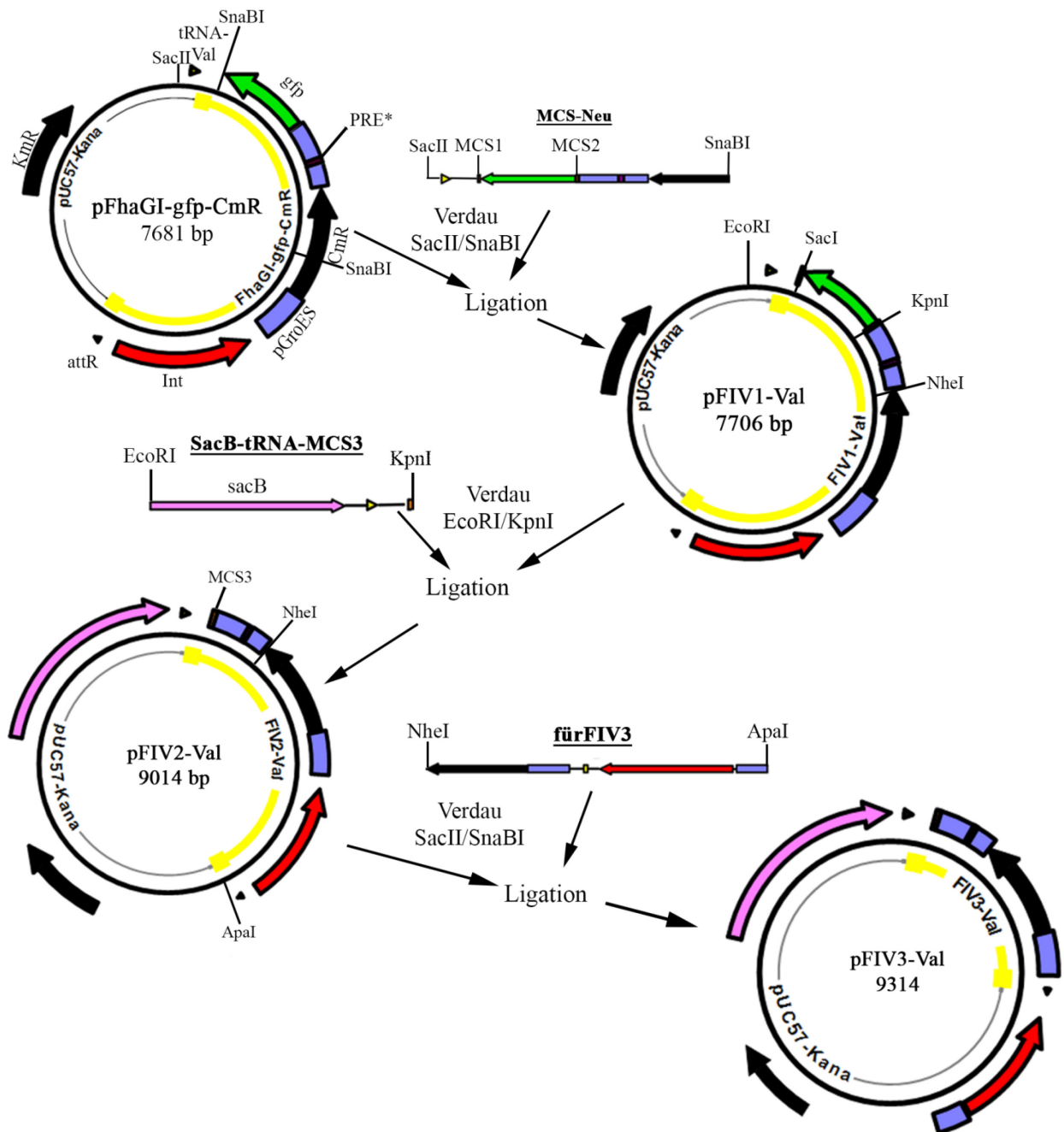
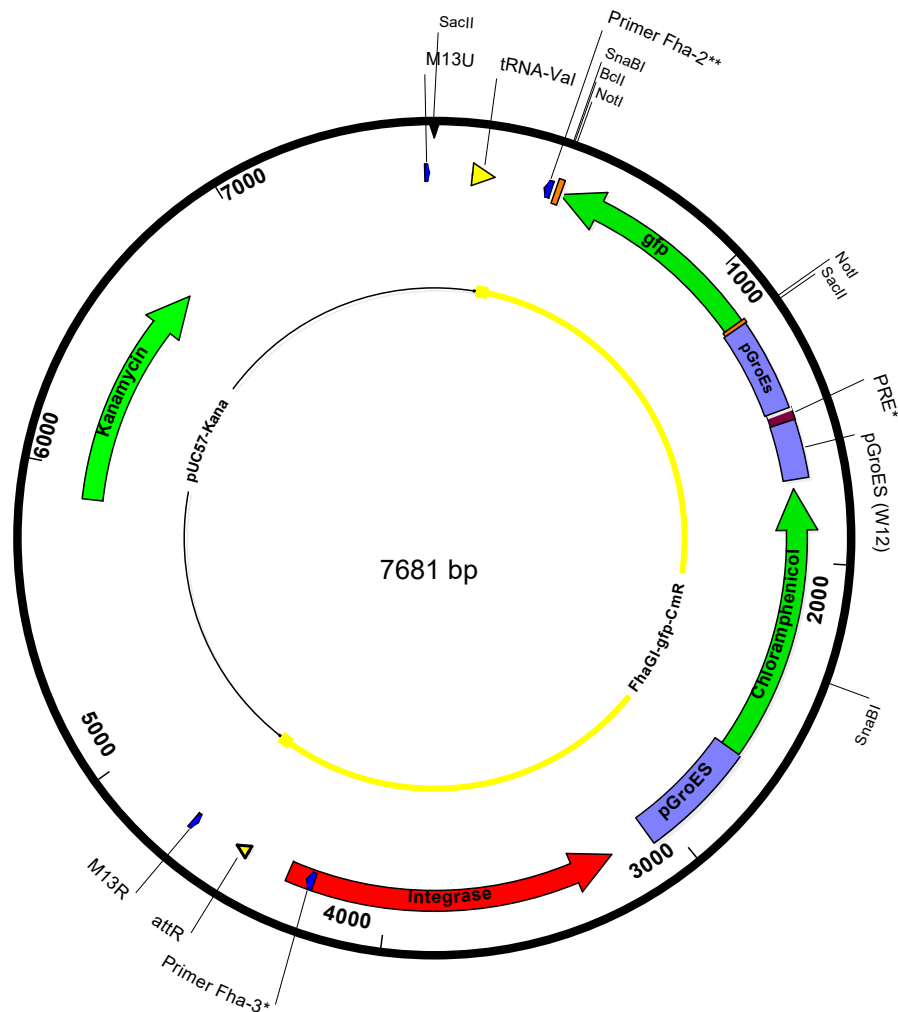


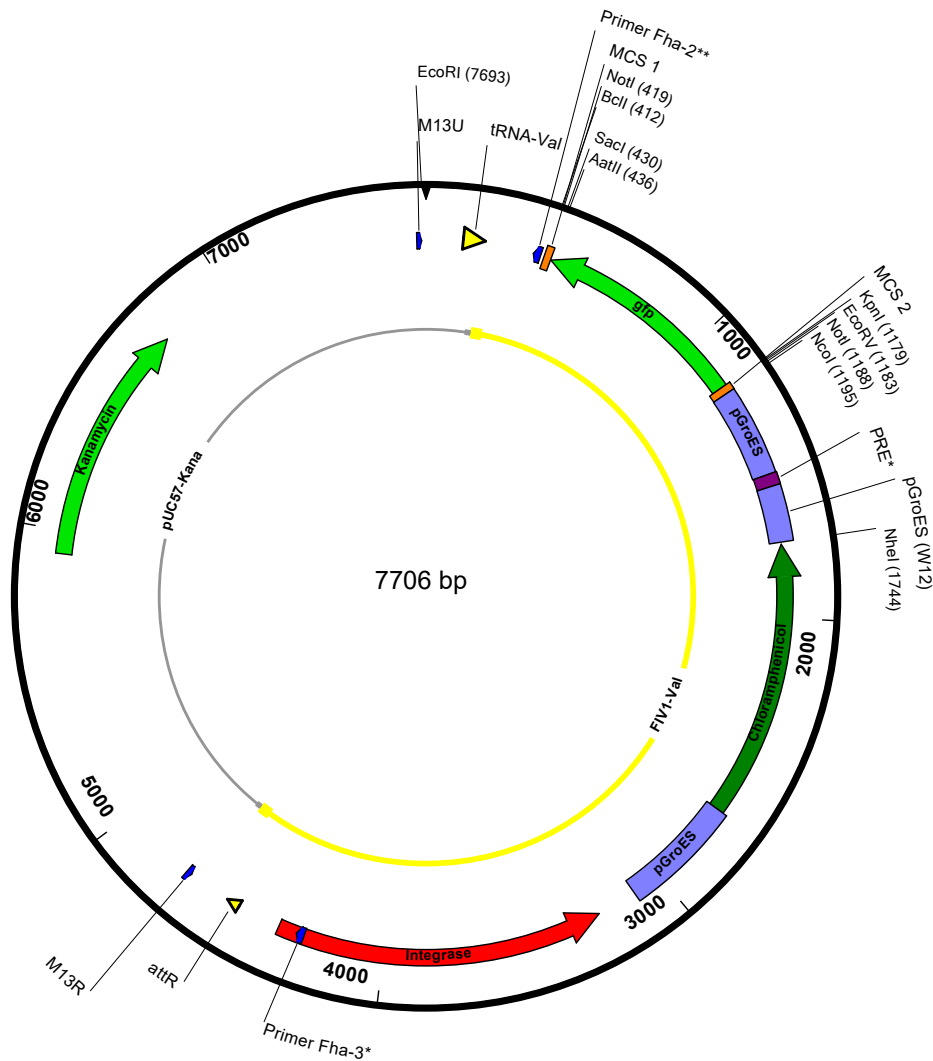
Abbildung 44: Schema der Klonierung der FIV-Vektoren. Es sind Vektorkarten und Restriktionsfragmente gezeigt, die für die Konstruktion der pFIV-Val-Vektoren eingesetzt wurde. Antibiotikaresistenzkassetten für Kanamycin (KmR) und Chloramphenicol (CmR) sind in schwarz gezeigt; Dreiecke repräsentieren die tRNA^{Val} und die attR-Stelle; Promotoren sind in blau dargestellt und das Integrasegen in rot. Der FIV-Val-Teil der Vektoren, der in das Genom von *Francisella*-Transformanden integriert, ist durch eine gelbe Linie hervorgehoben. Genutzte Restriktionsstellen sind eingezeichnet (verändert nach Tlapák et al., 2018).

pFhaGI-gfp-CmR Vektorkarte:

Primer	Primersequenz (5'- 3')	Primerposition
M13 U	GTAAAACGACGGCCAGT	7650- 7665
M13 R	GGAAACAGCTATGACCATG	4706- 4688
Fha 2**	ATTAGCAATGAGTTAGCTTGTTGCT	398- 373
Fha 3*	CTGAGAATTAAGCCACTTATATCAGAAT	4252- 4279

Enzymes die nicht schneiden:

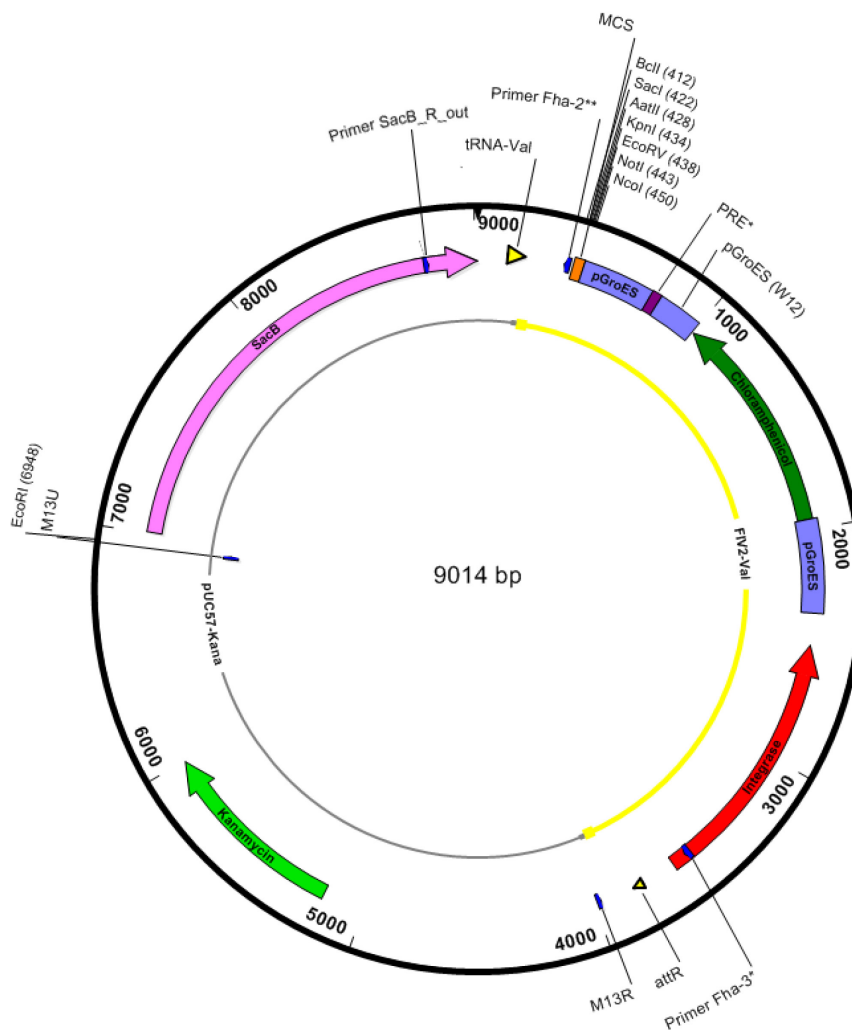
AarI, AatII, Acc65I, AfeI, AhdI, AscI, AvrII, BaeI, BaeI, BbvCI, BcgI, BclI, BglII, BmgBI, BmtI, BplI, BseRI, BsgI, BsiWI, BspMI, BssHII, BstEII, BstXI, Bsu36I, EcoRV, FseI, FspAI, KpnI, MluI, NheI, PmeI, PpuMI, PshAI, PstI, PstI, RsrII, SanDI, SexAI, SfiI, SgrAI, SrfI, XcmI, XhoI, ZraI

pFIV1-Val Vektorarte:

Primer	Primersequenz (5'- 3')	Primerposition
M13 U	GTAAACGACGGCCAGT	7675- 7691
M13 R	GGAAACAGCTATGACCATG	4731- 4713
Fha 2**	ATTAGCAATGAGTTAGCTTGTTGCT	398- 373
Fha 3*	CTGAGAATTAAGCCACTTATATCAGAAT	4277- 4304

Enzyme, die nicht schneiden:

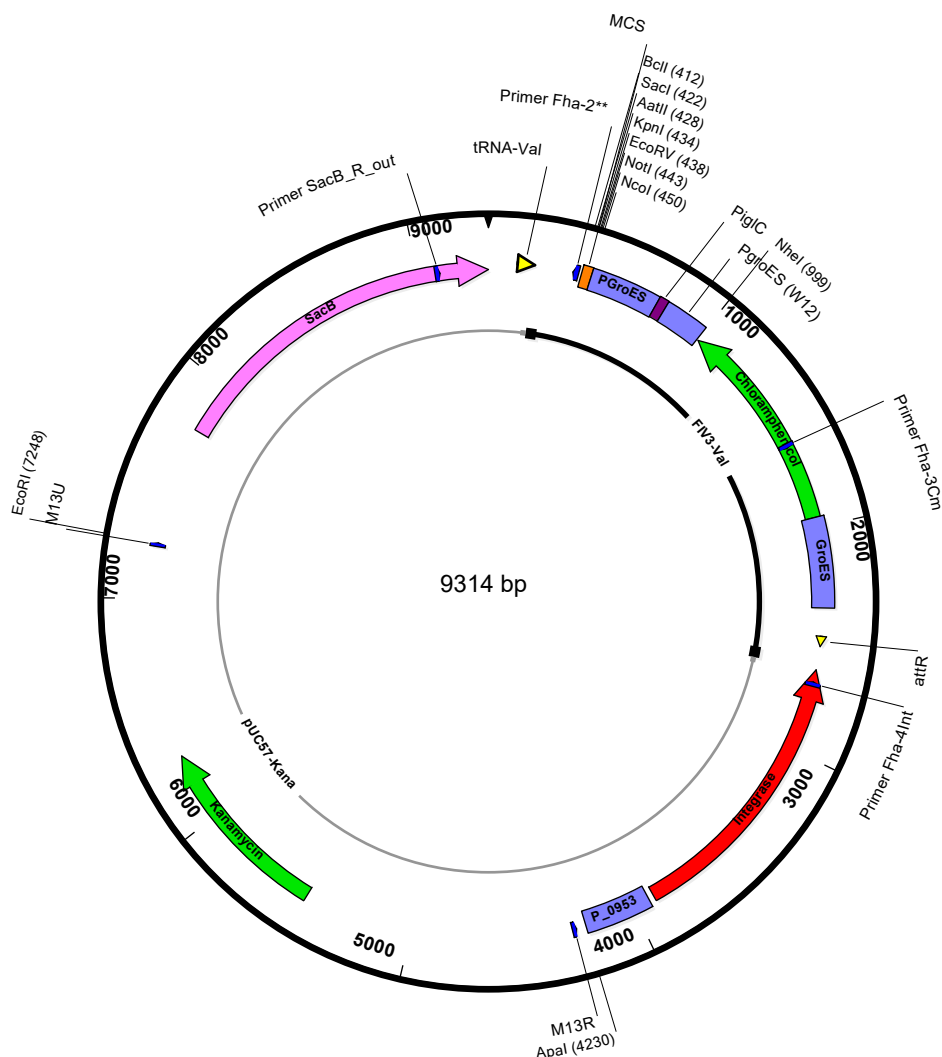
AarI, AfeI, AhdI, AscI, AvrII, BaeI, BaeI, BbvCI, BcgI, BcgI, BglII, BmgBI, BplI, BseRI, BsgI, BsiWI, BspMI, BssHII, BstEII, BstXI, Bsu36I, FseI, FspAI, MluI, PmeI, PpuMI, PshAI, PsrI, PsrI, RsrII, SanDI, SexAI, SfiI, SgrAI, SrfI, XcmI, XhoI

pFIV2-Val Vektorkarte:

Primer	Primersequenz (5' - 3')	Primerposition
M13 U	GTAAAACGACGGCCAGT	6930- 6946
M13 R	GGAAACAGCTATGACCATG	3986- 3968
SacB_R_out	CTACGCAGACAAACAATCAACGT	8775- 8797
Fha 2**	ATTAGCAATGAGTTAGCTTGTGCT	398- 373
Fha 3*	CTGAGAATTAAGCCACTTATATCAGAAT	3532- 3559

Enzyme, die nicht schneiden:

AarI, AfeI, AhdI, AscI, AvrII, BbsI, BbvCI, BcgI, BclI, BglII, BmgBI, BsaI, BseRI, BsiWI, BssHII, BstEII, BstXI, Bsu36I, FseI, FspAI, MfeI, MluI, PmeI, PmlI, PpuMI, PshAI, PsrI, PsrI, RsrII, SacII, SanDI, SexAI, SfiI, SgrAI, SrfI, XcmI, XhoI



Primer	Primersquenz (5'– 3')	Primerposition
M13 U	GTAAAACGACGGCCAGT	7230- 7246
M13 R	GGAAACAGCTATGACCATG	4286- 4268
SacB_R_out	CTACGCAGACAAACAATCAACGT	9075- 9097
Fha-2**	ATTAGCAATGAGTTAGCTTGTTGCT	398- 373
Fha-3Cm	AGCTCACCGTCTTTTCATTGCC	1607- 1627
Fha-4Int	CCTGTGTTGAGCCTGTACCA	2708- 2689

AarI, AfeI, AhdI, AscI, AvrII, BbsI, BbvCI, BcgI, BcgI, BglII, BmgBI, BsaI, BsiWI, BssHII, BstEII, BstXI, Bsu36I, FseI, FspAI, MfeI, MluI, PmeI, PmlI, PpuMI, PshAI, PsrI, PstI, RsrII, SacII, SanDI, SexAI, SfiI, SgrAI, SrfI, XcmI, XhoI

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Definition
Amp	Ampicillin
AmpR	Ampicillinresistenzkassette
AS	Aminosäure
<i>att</i>	<i>attachment site</i> , Bindungsstelle
<i>attB</i>	Bakterienbindungsstelle
<i>attP</i>	Phagenbindungsstelle
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> , Hirn-Herz-Infusion
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
CDC	<i>Centres for Disease Control and Prevention</i>
CFU	<i>colony forming unit</i> , koloniebildende Einheit
Cm	Chloramphenicol
CmR	Chloramphenicolresistenzkassette
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DR	<i>driect repeat</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FCP	<i>Francisella-containing phagosome</i>
<i>Fhis</i>	<i>Francisella hispaniensis</i>
FIV-Val	<i>Francisella Integrationsvektor</i> - tRNA ^{Val} -spezifisch

<i>Fno</i>	<i>Francisella novicida</i>
<i>Fph</i>	<i>Francisella philomiragia</i>
FPI	<i>Francisella</i> -Pathogenitätsinsel
<i>Ft</i>	<i>Francisella tularensis</i>
<i>Fth</i>	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>
<i>Ftt</i>	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>
GI	genomische Insel
H ₂ O _d	destilliertes Wasser
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
HCA	<i>Cysteine Heart Agar</i> , Cystein-Herz-Agar
HRP	<i>horse reddish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
ICE	<i>Integrative conjugative element</i>
IHF	<i>integration host factor</i>
Int	Integrase
IS	<i>insertion sequence</i>
Km	Kanamycin
KmR	Kanamycinresistenzkassette
LB	<i>lysogenic broth</i> (Luria und Bertani)
LVS	<i>live vaccine strain</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MGE	Mobiles genetisches Element

MOI	<i>multiplicity of infection</i>
NC	Nitrocellulose
NCBI	<i>National Centre for Biotechnology Information</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i> , Offener Leserahmen
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
Pr	Promotor
PRE	PigR response element
RDF	<i>Recombination directionality factor</i>
SF	Superfamilie
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>tris buffered saline</i> , trisgepufferte Salzlösung
TF	Transformation
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett
Val	Valin

Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt PD Dr. Heuner, der die Durchführung meiner Doktorarbeit am Robert Koch-Institut ermöglicht hat, für die hervorragende Betreuung, das tolle Arbeitsklima, die stets offene Tür und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Eitinger danke ich für die Betreuung von Seiten der Humboldt-Universität zu Berlin.

Den Kollegen von ZBS2 möchte ich für das angenehme Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft danken. Meinen Mit-Doktorandinnen der „AG Heuner“, Kristin Köppen und Mareike Kunze, danke ich für die gute Laune sowohl im Labor als auch außerhalb. Mein besonderer Dank gilt Kerstin Rydzewski für die mühelose Zusammenarbeit, die fortwährende Unterstützung und das immer offene Ohr, nur eine Frage oder einen Blick über den Bildschirmrand entfernt.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich während der gesamten Zeit unterstützt haben, sich mit mir über jeden Teilerfolg gefreut haben und den Ausgleich zur Arbeit geliefert haben.

Tagungen und Publikationen

Tagungen:

2016

- Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 11.09.-14.09.2016, Ulm, *Poster*, Titel: Construction of a phage integration vector for *Francisella tularensis*

2017

- Microbiology and Infection 2017, Gemeinsame Tagung der deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 05.03-08.03.2017, Würzburg, *Poster*, Titel: Development of phage integration vectors for *Francisella tularensis*

Publikationen:

Rydzewski, K., **Tlapák, H.**, Niehaus, I.P., Dabrowski, P.W., Grunow, R., Heuner, K., (2015). Identification and characterization of episomal forms of integrative genomic islands in the genus *Francisella*. *Int. J. Med. Microbiol.* 305, 874-880.

Gillmaier, N., Schunder, E., Kutzner, E., **Tlapák, H.**, Rydzewski, K., Herrmann, V., Stammler, M., Lasch, P., Eisenreich, W., Heuner, K., (2016). Growth-related Metabolism of the Carbon Storage Poly-3-hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*. *J. Biol. Chem.* 291, 6471-6482.

Tlapák, H., Rydzewski, K., Schulz, T., Weschka, D., Schunder, E., Heuner, K., (2017). Functional Analysis of the Alternative Sigma-28 Factor FliA and Its Anti-Sigma Factor FlgM of the Nonflagellated *Legionella* Species *L. oakridgensis*. *J. Bacteriol.* 199.

Tlapák, H., Köppen, K., Rydzewski, K., Grunow, R., Heuner, K., (2018). Construction of a New Phage Integration Vector pFIV-Val for Use in Different *Francisella* Species. *Front Cell Infect Microbiol* 8, 75.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Ich versichere außerdem, dass ich die vorliegende Dissertation nur in diesem und in keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Berlin, 2019

Hana Tlapák